



JENNY ROXANA SOBENES GUTIÉRREZ

**“APROVEITAMENTO DE SORO DESPROTEINADO DE
QUEIJO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA POR
X. campestris ATCC 13951”**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

JENNY ROXANA SOBENES GUTIÉRREZ

**“APROVEITAMENTO DE SORO DESPROTEINADO DE
QUEIJO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA POR
X. campestris ATCC 13951”**

Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Engenharia
de Alimentos

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA JENNY ROXANA SOBENES GUTIÉRREZ
E ORIENTADA PELO PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE**

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

So18a Sobenes Gutiérrez, Jenny Roxana, 1979-
Aproveitamento de soro desproteinado de queijo para produção de goma xantana por *X. campestris* ATCC 13951 / Jenny Roxana Sobenes Gutiérrez. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Goma xantana. 2. *Xanthomonas Campestris*. 3. Soro de queijo. I. Monte Alegre, Ranulfo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Use of de-proteinated cheese whey to production of xanthan gum by *X. campestris* ATCC 13951

Palavras-chave em inglês:

Xanthan gum

Xanthomonas campestris

Cheese whey

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Ranulfo Monte Alegre [Orientador]

Marta Cristina Teixeira Duarte

Reinaldo Gaspar Bastos

Data de defesa: 27-09-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
Membro Titular

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
Membro Titular

Profa. Dra. Giovana Da Silva Padilha
Membro Suplente

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
Membro Suplente

Setembro - 2013

“Procure ser uma pessoa de valor em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso, o sucesso é consequência”.

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho a minha família:

Aos meus pais, Maria Soledad e José Santos aos quais devo tudo o que sou hoje.

Aos meus irmãos, Jeannette, Ericka, Patricia e José por seu carinho e apoio incondicional.

Aos meus sobrinhos, Camila, Valeria e Santiago, por ter se convertido na minha alegria nos últimos anos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus por me guiar, cuidar e conduzir durante todo este tempo.

Agradeço a minha família e de forma muito especial aos meus pais Maria Soledad Gutiérrez de Sobenes e José Santos Sobenes Paulet que me deram seu amor e carinho a cada instante e que acreditaram em mim desde o primeiro momento quando contei para eles a minha decisão de vir estudar no Brasil, obrigada por todo seu apoio moral para conseguir os meus objetivos, por me dar a força necessária durante todo este tempo para seguir adiante, muito obrigada também pela sua ajuda econômica, sem ela não teria conseguido. Sou grata às minhas irmãs as quais sempre estiveram me apoiando moral e economicamente mesmo à distância obrigada Jeannette, Ericka e Patricia. A todos vocês todo meu Amor e agradecimento.

À Faculdade de engenharia de Alimentos – UNICAMP, pela oportunidade oferecida para crescer profissionalmente com a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ranulfo Monte Alegre, em primeiro lugar pela confiança e pela amizade oferecida durante estes anos, obrigada pela orientação no desenvolvimento do meu trabalho e pela paciência.

Ao CNPq pelo apoio econômico para conseguir concluir o presente trabalho.

Aos meus amigos pelo carinho e por estarem sempre a meu lado nos momentos que mais precisei de ajuda e apoio, obrigada Julio Rodríguez, Enith Altamirano.

Devo muito aos meus colegas da turma de mestrado e doutorado 2011 em quem encontrei todo o apoio que precisei levando em conta as dificuldades que se apresentaram nos primeiros momentos, obrigada Giovani Zobot, Carolina López, Fiorella Cardenas, Moysés Naves, Janaina Miranda, Silvia Alcazar, Marcus Bruno, Liara Macedo, Philippe dos Santos, Renato Sano e todos aqueles que estiveram prestes a me oferecer seu apoio desinteressado, muito obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Agradeço ao pessoal do Laboratorio de Tratamento de resíduos, que me fizeram sentir parte do time, obrigada Cláudia Viana por compartilhar comigo seus conhecimentos e experiência profissional e pela amizade, obrigada Giovana Padilha, Marcio de Barros, Meiri Brum, Cesar Piedrahíta, Luana Pereira, Oswaldo Kameyama pela amizade e apoio com a parte experimental deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	XXI
ABSTRACT	XXII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1. OBJETIVO GERAL	4
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1. POLISSACARIDEOS BACTERIANOS	5
4.2. <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i>	5
4.3. USO DE POLISSACARIDEOS BACTERIANOS EM ALIMENTOS.....	7
4.4. GOMA XANTANA	8
4.4.1. Origem da Xantana.....	8
4.4.2. Biosíntese da Xantana.....	9
4.4.3. Estrutura da Xantana	10
4.4.4. Propriedades físicas da Xantana	13
4.4.5. Aplicações da Xantana	14
4.4.6. Produção da Xantana	16
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1. MATERIAL.....	28
5.1.1. Micro-organismo	28
5.1.2. Meio de crescimento e manutenção do Micro-organismo.....	28
5.1.3. Meio de cultura e reagentes	28
5.1.4. Meio para preparo do pré-inoculo.....	29
5.1.5. Meio para preparo do inoculo para fermentação	29
5.2. MÉTODOS.....	30
5.2.1. Testes preliminares	30
5.2.2. Preparo do meio para manutenção do micro-organismo.....	30
5.2.3. Preparo do soro de queijo desproteinado e hidrolisado.....	30
5.2.4. Métodos analíticos - Meio de cultura	31

5.2.5. Métodos de cultivo.....	32
5.2.6. Otimização da produção de goma xantana através de Delineamento central composicional rotacional (DCCR).....	33
5.2.7. Comprovação do meio de cultura otimizado para produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> ATCC 13951.....	34
5.2.8. Métodos analíticos - Meio fermentado.....	35
5.2.9. Curvas de produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida no meio.....	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6.1. ANÁLISE DA MATERIA-PRIMA.....	37
6.2. TESTES PRELIMINARES.....	37
6.3. FERMENTAÇÃO DE SORO DE QUEIJO DESPROTEINADO.....	38
6.3.1. Otimização da produção de goma xantana através de Delineamento composto central rotacional em meio constituído de soro de queijo desproteinado, extrato de levedura e sulfato de amônio.....	38
6.3.2. Otimização da produção de goma xantana através de Delineamento composto central rotacional para o meio constituído de soro de queijo desproteinado, extrato de levedura e uréia.....	56
6.3.3. Confirmação experimental das condições otimizadas para cada um dos meios utilizados.....	73
6.3.4. Comportamento do pH dos meios otimizados contendo sulfato de amônio e uréia como fontes de nitrogênio, ao longo do tempo de fermentação.....	76
6.3.5. Produção de goma xantana excluindo do meio de cultivo as fontes de nitrogênio.....	76
7. CONCLUSÕES.....	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição porcentual média de soro de queijo dos diferentes processos comerciais	24
Tabela 2 - Dados estimados de produção e projeção de produção de queijo (Soro - Lactose)	26
Tabela 3 - Composição do meio de cultura utilizado	28
Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR para três fatores.....	33
Tabela 5 - Composição dos meios de cultura para produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> ATCC 13951 - DCCR para concentrações de lactose, extrato de levedura, sulfato de amônio e/ou uréia.	34
Tabela 6 - Composição do meio de cultura para validação da produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> ATCC 13951.....	34
Tabela 7 - Produção de goma e biomassa em 24, 48 e 72 h de fermentação em meio soro de queijo desproteinado sem hidrolizar, suplementado com extrato de levedura..	37
Tabela 8 - Produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> utilizando soro de queijo desproteinado suplementado com sulfato de amônio; biomassa produzida e lactose consumida (g/L).	39
Tabela 9 - Valores de pH para os diferentes ensaios do DCCR (2 ³) no processo de produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com de extrato de levedura e sulfato e amônio como fonte de nitrogênio.....	45
Tabela 10 - Coeficientes de regressão para a resposta concentração de goma xantana (g/L) usando como meio soro de queijo desproteinado, suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.	46
Tabela 11 - ANOVA para resposta produção de goma xantana (g/L) para 72 h de fermentação, usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....	47

Tabela 12 - Coeficientes de regressão para a resposta produção de biomassa (g/L) usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio.	49
Tabela 13 - ANOVA para resposta produção de biomassa (g/L) para 72 h de fermentação usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....	50
Tabela 14 - Coeficientes de regressão para lactose consumida (g/L) usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio em 72 h de fermentação.	53
Tabela 15 - ANOVA para resposta Lactose consumida (g/L) para 72h de fermentação usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com de extrato de levedura e sulfato de amônio.	54
Tabela 16 - Produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> utilizando soro de queijo desproteinado suplementado com uréia: goma xantana, biomassa e lactose consumida (g/L).....	57
Tabela 17 - Valores de pH observados para os diferentes ensaios em fermentação de soro de queijo desproteinado para produção de goma xantana.....	62
Tabela 18 - Coeficientes de regressão para a resposta concentração de goma xantana (g/L) usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia como fonte de nitrogênio.....	63
Tabela 19 - ANOVA para resposta produção de goma xantana (g/L) para 72h de fermentação usando como meio soro desproteinado de queijo acrescentado de extrato de levedura e uréia como fonte de nitrogênio.	64
Tabela 20 - Coeficientes de regressão para a resposta produção de biomassa usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com de extrato de levedura e uréia.	66
Tabela 21 - ANOVA para resposta produção de biomassa utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia.....	67

Tabela 22 - Coeficientes de regressão para a resposta lactose consumida utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia.	70
Tabela 23 - ANOVA para resposta lactose consumida utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia.....	71
Tabela 24 - Concentração de goma xantana, concentração de biomassa e lactose consumida (g/L) em meio constituído por soro de queijo desproteinado contendo sulfato de amônio e uréia.	73
Tabela 25 - Valores de pH dos meios constituídos por soro de queijo desproteinado suplementados com sulfato de amônio.	76
Tabela 26 - Produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida (g/L) por <i>X. campestris</i> utilizando como meio soro desproteinado suplementado com extrato de levedura.	78
Tabela 27 - Produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida (g/L) por <i>X. campestris</i> meio constituído apenas por soro de queijo desproteinado.	78
Tabela 28 - Produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida (g/L) por <i>X. campestris</i> em soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio, soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e soro de queijo desproteinado sem suplementação.	79
Tabela 29 - Valores de pH dos meios: soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio; soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e soro de queijo despreteinado.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Xanthomonas campestris</i>	7
Figura 2 - Estrutura química da Goma Xantana.....	12
Figura 3 - Soro de queijo	24
Figura 4 - Dados e projeção da produção de queijo (Soro-Lactose) Brasil 2009.....	27
Figura 5 - Separação da proteína do soro	29
Figura 6 - Produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> em meio soro de queijo desproteinado, suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).	41
Figura 7 - Produção de Biomassa de <i>X. campestris</i> usando como meio soro de queijo desproteinado, suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).	42
Figura 8 - Lactose consumida no processo de produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> usando como meio soro de queijo desproteinado desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. 43	
Figura 9 – Rendimento na produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> usando como meio soro desproteinado de queijo suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....	44
Figura 10 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a produção de goma xantana (g/L).	47
Figura 11 - Superfícies de resposta para produção de goma xantana (g/L) em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a), da concentração de lactose e de sulfato de amônio (b) e da concentração de extrato de levedura e de sulfato de amônio (c).	48
Figura 12 - Concentrações de biomassa preditos pelo modelo matemático versus concentrações experimentais.....	51
Figura 13 - Superfícies de resposta para produção de biomassa (g/L) em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a), da concentração de lactose e de	

sulfato de amônio (b) e da concentração de extrato de levedura e de sulfato de amônio (c).	52
Figura 14 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta lactose consumida.....	54
Figura 15 - Superfícies de resposta para lactose consumida (g/L) em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a) e da concentração de lactose e de sulfato de amônio (b).	55
Figura 16 - Produção de goma xantana utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).....	59
Figura 17 - Produção de biomassa <i>X. campestris</i> utilizando como meio, soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).....	59
Figura 18 - Lactose consumida no processo de produção de goma xantana utilizando como meio, soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).	60
Figura 19 – Rendimento no processo de produção de goma xantana utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado desproteinado com extrato de levedura e uréia para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).	61
Figura 20 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta produção de goma xantana.	64
Figura 21 - Superfícies de resposta para produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a), da cocentração de lactose e de uréia (b) e da concentração de extrato de levedura e de uréia (c).....	65
Figura 22 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta produção de biomassa.	68
Figura 23 - Superfícies de resposta para produção de biomassa em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a), da concentração de lactose e de uréia (b) e da concentração de extrato de levedura e de uréia (c).....	69

Figura 24 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta lactose consumida.....	71
Figura 25 - Superfícies de resposta para lactose consumida (g/L) em função a concentração de lactose e concentração de extrato de levedura (a), e da cocentração de lactose e concentração de uréia (b).	72
Figura 26 - Concentração de goma xantana, biomassa, lactose consumida e lactose remanescente (g/L) em fermentação de soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio.....	74
Figura 27 - Produção de goma xantana, biomassa, lactose consumida e lactose remanescente (g/L) em fermentação de soro de queijo desproteinado contendo uréia como fonte de nitrogênio.	74
Figura 28 - Produção de goma xantana após 72 h de fermentação utilizando uréia ou sulfato de amônio como fontes de nitrogênio.	75
Figura 29 - Produção de goma xantana por <i>X. campestris</i> nos meios soro desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio (A); soro desproteinado suplementado com extrato de levedura (B) e soro desproteinado (C).....	80
Figura 30 - Goma xantana produzida por <i>X. campestris</i> após 72 h de fermentação, para os meios A, B e C.	80
Figura 31 - Produção de biomassa na fermentação dos meios soro desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio (A); soro desproteinado suplementado com extrato de levedura (B) e soro desproteinado (C).....	81
Figura 32 - Lactose consumida em fermentação dos meios soro desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio (A); soro desproteinado suplementado com extrato de levedura (B) e soro desproteinado (C).....	81

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de goma xantana utilizando *X. campestris* ATCC 13951 e soro de queijo desproteinado. Foram feitos ensaios preliminares para determinar as condições de fermentação: 29 °C, pH inicial 7,0 e 180 rpm em agitador orbital por 72 horas. Fez-se dois planejamentos experimentais utilizando as variáveis: concentração de lactose no soro de queijo, concentração de extrato de levedura e sulfato de amônio ou uréia como fonte de nitrogênio. O melhor resultado quanto à produção de goma foi obtido com meio contendo soro desproteinado, lactose (44 g/L), extrato de levedura (3 g/L) e sulfato de amônio (1,5 g/L) cuja produção de goma alcançou 20,28 g/L em 72 h de fermentação. Em meio constituído de soro desproteinado, lactose (44 g/L), extrato de levedura (3 g/L) e uréia (2 g/L) no lugar de sulfato de amônio, a produção de goma alcançou 18,96 g/L. Entretanto, utilizando apenas o soro de queijo desproteinado, a produção de goma foi praticamente a mesma, atingindo 19,68 g/L. Portanto, a suplementação do soro de queijo desproteinado com fontes de nitrogênio para produção de goma xantana é desnecessária, visto que as frações de proteínas e outros compostos nitrogenados do leite foram suficientes para suprir este elemento à bactéria. O aumento da concentração de lactose no soro desproteinado não aumentou a produção de goma, obtendo-se melhores resultados em meio com baixa concentração da fonte de carbono.

Sendo o soro de queijo um sub-produto abundante e de baixo custo, este processo torna-se interessante na produção de goma xantana, visto que este polissacarídeo tem importante utilização a nível industrial sendo atualmente muito utilizada na elaboração de produtos alimentícios.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the xanthan gum production using *X. campestris* ATCC 13951 and de-proteinated cheese whey. Some preliminary assays indicated as good fermentation condition 29 °C, initial pH 7.0 and 180 rpm in shaker during 72 hours. Some assays were done obeying experimental planning being the variables the lactose concentration at the de-proteinated cheese whey, yeast extract concentration and ammonium sulfate or urea as nitrogen source. The best result was obtained in the medium using de-proteinated cheese whey containing 44 g/L of lactose, 3 g/L of yeast extract and 1.5 g/L of ammonium sulfate, where the gum production reached 20.28 g/L. At the medium using de-proteinated cheese whey (44 g/L of lactose), yeast extract (3 g/L) and ammonium sulfate replaced by urea (2 g/L) the gum reached 18.96 g/L. However, when the de-proteinated cheese whey was used alone as culture medium the gum production, almost reached the same concentration (19.68 g/L). Therefore, the cheese whey supplementation with nitrogen sources to xanthan gum production is not necessary, since the protein fractions and others compounds containing nitrogen from whey that remain in the de-proteinated cheese whey are sufficient to supply this element at the bacteria. The increase of the lactose concentration in the de-proteinated cheese whey do not increase the gum production obtaining better results in half with low concentration of carbon source.

Cheese whey is an abundant and low cost byproduct, so this process becomes interesting for the production of xanthan gum, since it has important industrial use being widely used in the preparation of food products.

1. INTRODUÇÃO

Os biopolímeros são macromoléculas formadas por monossacarídeos e derivados ácidos, podendo ser sintetizados por bactérias, fungos e leveduras. Por suas características reológicas, os biopolímeros encontram ampla aplicação em processos industriais e particularmente na indústria de alimentos.

A goma xantana é um heteropolímero produzido em processos fermentativos por micro-organismos do gênero *Xanthomonas* espécie *X. campestris*, a qual é composta de duas moléculas de manose e uma de ácido glucurônico. Este polissacarídeo tem ganhado ampla aplicação industrial devido a sua habilidade de se dissolver tanto em água fria quanto quente, além de apresentar uma alta viscosidade em comparação com outras gomas, inclusive em baixas concentrações como 0,05% (p/v) (WAITES, 2001).

A produção, comercialização e utilização da goma xantana como espessante e estabilizante tem se tornado crescente nos últimos anos. Aproximadamente 50 000 tons de goma xantana são produzidas anualmente consumidas entre outras, pelas indústrias de petróleo, alimentos, farmacéutica e de produtos agrícolas; a indústria de alimentos utiliza aproximadamente 40% da produção anual de goma xantana como estabilizante, ganhando na atualidade quase um quarto do mercado Norte Americano como estabilizante em alimentos; no entanto, a utilização desta goma é limitada devido a seu alto custo quando comparado ao preço do amido ou outros polímeros sintéticos (WAITES, 2001; ROSALAM e ENGLAND, 2006).

A nível industrial, a goma xantana é o polímero mais utilizado em Recuperação Terciária de Petróleo (EOR), não tendo até o momento nenhum outro substituto em escala comercial que supere suas qualidades (NAVARRETE, 2000).

A xantana utilizada comercialmente no Brasil não é produzida em âmbito nacional, dependendo exclusivamente de importações. O Brasil tem um elevado potencial econômico para a implantação da indústria de produção de goma xantana, uma vez que possui matéria-prima básica para a produção e recuperação da goma já que é bom produtor dos insumos básicos para produção de xantana, que são açúcar e álcool, colocando o país numa posição favorável e competitiva frente a países que dominam esta tecnologia, como o Japão, Estados Unidos, França, Áustria e China. (BORGES e VENDRUSCOLO, 2008; SOUZA *et al.*, 2012). No entanto o uso de açúcar puro (sacarose) como fonte de carbono para produção da goma xantana incrementa o custo de produção deste polissacarídeo, razão pela qual se tem procurado outras fontes a serem utilizadas no seu processo de elaboração.

O Brasil é um dos países com maior produção de leite e derivados lácteos. Em 2009, a produção de queijo no Brasil foi de aproximadamente 614 000 tons, o que corresponde a uma produção de soro de aproximadamente 5 526 000 tons, o que segundo o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) irá aumentar nos próximos anos. Este fato torna possível a utilização deste subproduto da indústria de queijos; de alto valor nutricional e baixo custo, como meio fermentativo no processo de elaboração de goma xantana.

Assim é esperado que o Brasil, como muitos outros países latinoamericanos, consiga suprir a demanda deste polissacarídeo, conferindo-lhe maior valor agregado.

2. JUSTIFICATIVA

Na indústria de alimentos a goma xantana encontra ampla aplicabilidade pelas diversas características e vantagens reológicas que apresenta; é utilizada em panificação, produção de bebidas, derivados lácteos, sobremesas, frutas em calda, purês, temperos, molhos para saladas, carnes (bovina, frango e peixe), xaropes e coberturas, sorvetes, sucos artificiais, assim como também em alimentos para animais (WHISTLER e BEMILLER, 1993; NUSSINOVITCH, 1997).

A indústria de alimentos é uma das maiores produtoras de subprodutos e/ou rejeitos a nível mundial. Estima-se que pelo menos 10% dos resíduos totais produzidos pela atividade industrial e comercial, correspondem à indústria de alimentos. As águas residuais da indústria alimentícia caracteriza-se por seu conteúdo orgânico facilmente biodegradável (carboidratos, proteínas e lipídios) (DOBLE e KRUTHIVENTI, 2005).

Se estas águas antes de serem eliminadas, não receberem previamente o devido tratamento, pode-se originar sérios problemas ambientais já que pela natureza orgânica destas águas que contem elevadas concentrações de sólidos suspensos, a demanda biológica de oxigenio (DBO) e demanda química de oxigenio (DQO) para seu processo de degradação é muito alta (WANG, 2006).

A indústria de laticínios gera grandes volumens de águas residuárias no processamento dos diferentes derivados lacteos, principalmente na elaboração de queijos onde é gerado o soro. Na atualidade, o soro de queijo entre outros meios complexos provenientes de processos industriais primários, forma parte das inúmeras pesquisas na busca das melhores condições para a produção da goma xantana por processos fermentativos já que proporciona as condições necessárias para o crescimento dos micro-organismos que produzem este polissacarídeo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar o processo de produção de goma xantana por linhagem *X. campestris* ATCC 13951, utilizando soro de queijo desproteinado como meio de cultivo.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar as condições ótimas de produção de goma xantana, utilizando soro de queijo desproteinado como meio de cultivo.
- Estudar o efeito da concentração de lactose, extrato de levedura, sulfato de amônio ou uréia na produção de goma xantana.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. POLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

Muitas bactérias Gram-negativas sintetizam e excretam polímeros extracelulares (exopolissacarídeos-EPS) com diversas funções biológicas, assim como proteção da célula contra condições adversas do meio. Os EPS microbianos podem ser iônicos ou não iônicos, ramificados ou não ramificados e podem ser homopolissacarídeos, formados por um único tipo de polissacarídeo, como as gomas dextrana e curdulana; ou apresentar uma estrutura mais complexa contendo além de monossacarídeos alguns outros compostos químicos, como a goma xantana (SUTHERLAND, 1994; ANDRADE e ROJAS, 2012).

Os dois EPS com maior e merecido estudo e geralmente produzidos em escala comercial são a goma xantana, produzida por *Xanthomonas campestris* e goma gelana, produzida por *Sphingomonas paucimobilis* (ANDRADE e ROJAS, 2012).

4.2. *Xanthomonas campestris*

Xanthomonas é um gênero que pertence à família Pseudomonaceae. Todos os micro-organismos desse gênero são fitopatogênicos, com exceção do *Xanthomonas maltophilia* (SWINGS, CIVEROLO e SUTHERLAND, 1993; GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000).

Uma das mais sérias bacterioses de culturas vegetais é a Podridão Negra, causada pelo *X. campestris* pv. *campestris*. Essa doença pode ser observada em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e caracteriza-se por veias nas folhas que se tornam amarelas e negras. É de desenvolvimento rápido, propagando-se em poucas semanas, levando a planta à morte e, conseqüentemente, a grandes perdas econômicas (OLIVEIRA *et al.*, 2000; AZEVEDO, MICHEREFF e MARIANO, 2002).

O gênero *Xanthomonas* é composto por bactérias Gram-negativas não esporuladas, em forma de bastão com um único flagelo movel, estritamente aeróbia. São fitopatogênicas e geralmente apresentam-se como colônias mucóides capazes de produzir um polissacarídeo chamado xantana produzida por diferentes espécies do gênero *Xanthomonas*, como *X. fragariae*, *X. oryzae* pv. *Oryzae*, *X. campestris* sendo esta última a mais utilizada na produção de goma xantana a nível industrial (BRADBURY, 1984; GNANAMANICKAM, 2006).

Em comparação com as bactérias Gram-positivas, as bactérias Gram negativas apresentam parede celular mais fina, devido a menor quantidade de peptidoglicano, e tem como maior componente um macropolímero, chamado lipopolissacarídeo o qual fornece uma barreira hidrofílica à superfície celular (PORTILHO, 2002).

A presença de uma camada de polissacarídeo extracelular (EPS) aumenta a hidrofiliidade da superfície em muitas bactérias. O EPS pode formar uma camada coesiva e aderente, chamada “capsula”, ou formar um polissacarídeo livre e “mucilaginoso” com pouca ou nenhuma aderência celular. Pode-se utilizar o termo polissacarídeo extracelular ou exopolissacarídeo para ambos os tipos de polissacarídeo (SUTHERLAND, JEON e FRIEDLANDER, 1988).

A *Xanthomonas campestris* (Figura 1), desenvolve e produz exopolissacarídeos numa extensa gama de substratos de carbono, incluindo amino ácidos, ciclos intermediários de ácido cítrico e carboidratos. Sais de amônia ou amino ácidos podem ser utilizados como fonte de nitrogênio e são necessários varios ions para o crescimento da bacteria e a síntese e produção do polissacarídeo, a qual pode ser afetada na falta de algum destes componentes no meio (SUTHERLAND, 2005).

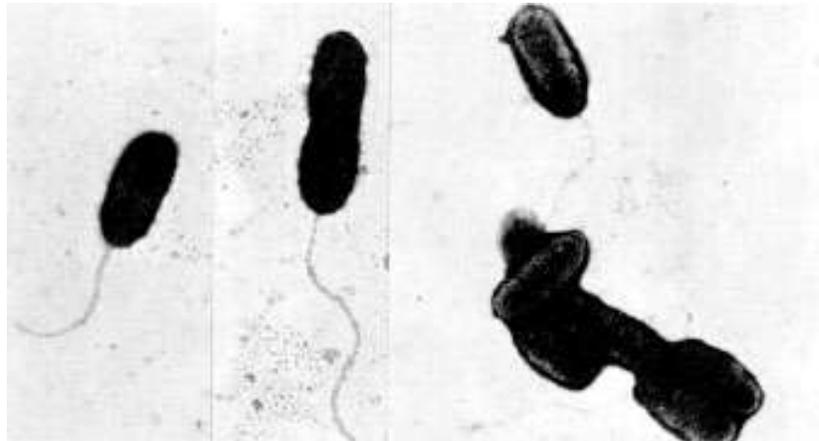


Figura 1 - *Xanthomonas campestris*

4.3. USO DE POLISSACARÍDEOS BACTERIANOS EM ALIMENTOS

Os polissacarídeos são incorporados nos alimentos pela capacidade de controle da textura dos mesmos, modificando as propriedades reológicas ou a presença de água, eles previnem ou reduzem a formação de cristais em alimentos congelados, assim como também têm influência na aparência, cor e sabor dos alimentos preparados. Por estas habilidades dos polissacarídeos, eles são utilizados para estabilizar espumas e emulsões (SUTHERLAND, 2005).

Geralmente os polissacarídeos adicionados aos alimentos provém de bactérias, leveduras, fungos, algas e plantas. Dentre os polissacarídeos microbianos, a dextrina foi o primeiro a ser comercializado e o primeiro a ser aprovado para uso alimentício, mas foi utilizado pouco tempo para este fim. Os exopolissacarídeos microbianos têm um uso mais limitado, e só dois deles são geralmente utilizados na indústria de alimentos, a xantana e a gelana (SUTHERLAND, 2005).

4.4. GOMA XANTANA

4.4.1. Origem da Xantana

Na década de 1950, uma nova geração de produtos surgiu no mercado internacional: os polissacarídeos de origem microbiana. Até então, os polissacarídeos utilizados eram os originados de plantas marinhas e terrestres. A produção microbiana desses polímeros em condições controladas de fermentação, garante um material de qualidade e fornecimento constante, vantagem que tem sobre a produção a partir de plantas; ainda a grande diversidade de estruturas químicas capaz de ser elaborada pelos micro-organismos possibilita a obtenção de polímeros hidrossolúveis com diferentes propriedades. A esse grupo de polissacarídeos solúveis em água, de origem vegetal, animal ou microbiológica, foi dada a designação de gomas industriais (LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009)

A goma xantana é o polímero que mais tem sido utilizado em alimentos em muitos países do mundo. Foi descoberto por pesquisadores do departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA) no Northern Regional Research Laboratory (NRRL) durante estudos de identificação de microorganismos que produzissem gomas solúveis em água e observaram que a bactéria *Xanthomonas campestris*, isolada de repolho roxo, produzia um polissacarídeo extracelular com excepcionais propriedades reológicas, sendo isolada pela primeira vez por Jeanes et al. em 1961 (WHISTLER e BEMILLER, 1993; KATZBAUER, 1998).

Após a descoberta da xantana, muitas pesquisas foram realizadas por diferentes laboratórios industriais até começar a ser produzida semi industrialmente nos Estados Unidos pela empresa Kelco. Inicialmente, a xantana foi introduzida na indústria com aplicações não alimentícias, mas, após ser comprovada a não toxicidade deste polissacarídeo pelo departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA) no laboratório de pesquisa de Western, em testes de alimentação aplicados até a 3ª geração em ratos e cães, a goma ganhou grande importância na indústria de alimentos,

sendo liberada pela U.S Food and Drug Administration (FDA) em 1969. Isto permitiu a utilização deste polissacarídeo numa ampla gama de produtos alimentícios como leite e derivados, carnes e produtos cárneos, panificação, sucos artificiais, entre outros, assim como em materiais que tem contato direto com os alimentos, como em embalagens. Posteriormente, a utilização da xantana em alimentos foi aprovada também pela Food and Agriculture Organization (FAO) e a World Health Organization (WHO) das nações unidas (WHISTLER e BEMILLER, 1993; NUSSINOVITCH, 1997; WAITES, 2001).

4.4.2. Biosíntese da Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo sintetizado por uma bactéria fitopatogênica do gênero *Xanthomonas*, e tem extrema importância comercial (FONTANIELLA *et al.*, 2002).

A cadeia da xantana é formada pela adição sequencial de D-glucose-1 phosphate e D-glucose, respectivamente, de dois mols de UDP-D-glucose. Depois disso, D-manose e ácido D-glucurônico são adicionados de GDP-manose e ácido UDP-glucurônico, respectivamente. Cada etapa requer de uma enzima específica e um substrato específico. Ausência de enzima ou de substrato inibe a síntese do polissacarídeo. Dependendo da cepa utilizada e as condições fisiológicas onde a bactéria tenha crescido e portanto da estrutura exata do polímero formado, grupos O-acetil são transferidos da CoA acetil ao resíduo de manose interna e piruvato do fosfoenolpiruvato é adicionado à manose terminal (SUTHERLAND, 2005).

A acetil CoA e o fosfoenolpiruvato não são facilmente aproveitados durante algumas fases de crescimento que permita a completa acilação das unidades repetitivas da xantana. Consequentemente, a xantana sintetizada no meio de cultura representa os produtos de todas as fases de crescimento e é possível uma mistura de vários tipos de moléculas com graus variáveis de acilação e massas variáveis (SUTHERLAND, 2005).

A síntese de xantana em laboratório pode ser por fermentação contínua ou intermitente. A maior parte, se não a totalidade, da produção comercial é feita em batelada (TAIT, SUTHERLAND e CLARKE-STURMAN, 1986; SWINGS, CIVEROLO e SUTHERLAND, 1993).

A xantana é sintetizada principalmente quando a bactéria parou de crescer. Usualmente a concentração final obtida é entre 20 e 30 g/L com rendimentos sobre açúcar que oscilam entre 50 e 70% e produtividades de 0,5 g/L-h (GARCÍA, QUINTERO e LÓPEZ, 2004).

4.4.3. Estrutura da Xantana

A composição química da xantana tem sido amplamente estudada, por se tratar de uma estrutura passível de mudanças ocasionadas pelas diferentes condições operacionais aplicadas durante a fermentação, como também pelo micro-organismo produtor (BORGES e VENDRUSCOLO, 2008).

O polissacarídeo xantana, produzido por diferentes espécies de *Xanthomonas*, contém normalmente glucose, manose e ácido glucurônico, exceto *X. vesicatoria*, que contém galactose em substituição à manose (ORENTAS, SLONEKER e JEANES, 1963).

A xantana apresenta-se com uma estrutura primária composta de repetidas unidades pentassacarídicas, sua estrutura foi elucidada por Jansson et. al em 1975 e consiste em uma cadeia principal de (1,4) β -D-glicose com estrutura muito parecida a da celulose. A esta cadeia principal de glucano, correntes laterais de trissacarídeos estão ligados alternadamente, através de O-3 (D-glicose da cadeia principal) ao C1 do primeiro resíduo β -d-manose. Na posição C2 desta unidade, está localizado uma unidade de ácido glucurônico, que está relacionada com a posição C1 da segunda unidade de D-manose. Um grupo de piruvato está ligado às posições 4 e 6 desta unidade de manose terminal, sendo a manose interna parcialmente acetilada no C6. A presença de ácido pirúvico na metade da unidade terminal de manose representa

aproximadamente 60% da molécula, conferindo a goma muitas das suas propriedades únicas de viscosidade, extraordinária resistência a hidrólise e propriedades de uniformidade física e química. A presença da cadeia lateral na estrutura deste polissacarídeo permite a completa hidratação dele em água (SLONEKER e JEANES, 1962; JANSSON, KENNE e LINDBERG, 1975; NUSSINOVITCH, 1997).

A literatura tem mostrado que variações quantitativas entre polímeros produzidos por diferentes micro-organismos do gênero *Xanthomonas*, são mais comuns que diferenças qualitativas. As principais variações são relativas ao conteúdo dos ácidos pirúvico e acético. O conteúdo de ácido pirúvico no polissacarídeo de diferentes espécies e cepas de *Xanthomonas* foi avaliado, inicialmente por Orentas, Sloneker e Jeans (1963), os resultados entre as espécies variaram de 1,05% a 7,64%.

A xantana comercial é acrescentada de piruvato na faixa de 30 a 40% e de acetato na faixa de 60 a 70% existindo substanciais variações nestas proporções (NUSSINOVITCH, 1997).

A molécula de xantana é perfeitamente regular quanto à presença de ramificações em uma glicose a cada duas. No entanto, há uma certa irregularidade, pois nem todas as cadeias laterais são acetiladas ou piruvatadas. Frequentemente, não está piruvatada mais que uma cadeia de cada duas, mas essa proporção varia em função da cepa utilizada e das condições de cultivo (LINDEN e LORIENT, 1996).

A estrutura secundária da xantana depende das condições sob as quais a molécula é caracterizada. A molécula pode estar em uma conformação ordenada ou desordenada. Dois modelos têm sido propostos para a estrutura secundária da molécula de xantana: simples e dupla hélice. A conformação ordenada pode ser nativa ou renaturada; não há consenso quanto à existência de relação entre a natividade da conformação e o tipo de estrutura verificada. A forma nativa está presente em temperaturas abaixo do ponto de transição conformacional da molécula, que depende da força iônica do meio em que a xantana produzida está dissolvida. A transição conformacional ordem-desordem é dirigida pela ocorrência de temperaturas acima do

ponto de transição e/ou a redução da força iônica. Tanto a manutenção da conformação nativa (ordenada), quanto a renaturada (re-ordenada) dependem dos mesmos fatores (BORN, LANGENDORFF e BOULENGUER, 2003).

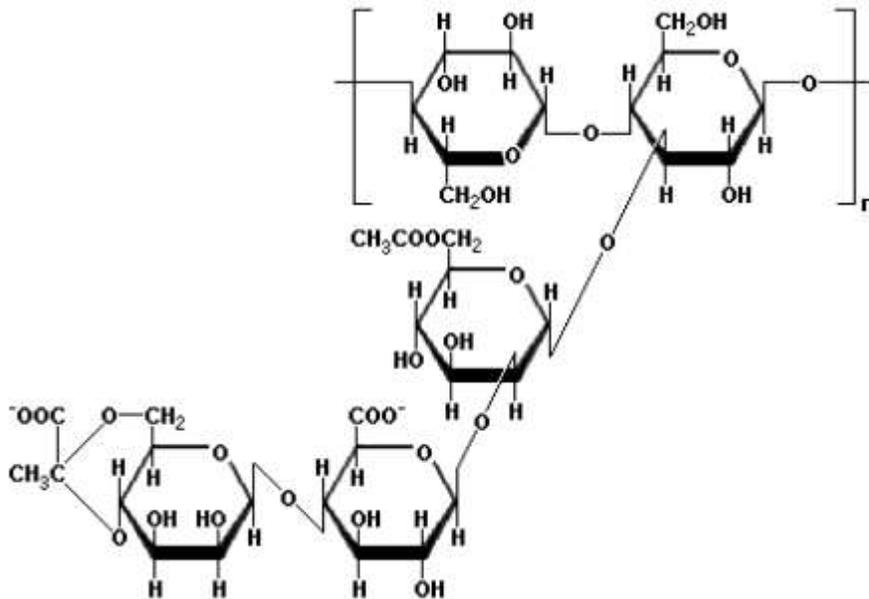


Figura 2 - Estrutura química da Goma Xantana

Fonte: Nussinovitch A. 1997. (Reproduzida com autorização da NutraSweet Kelco Co.)

O comprimento da molécula de xantana varia em função da cepa da bactéria utilizada, da composição do meio de cultura e do processamento de obtenção. Assim, alguns autores estimam que o peso molecular da xantana encontra-se na faixa de $3-7,5 \times 10^6$, outros autores reportam peso molecular de $2 - 2,5 \times 10^6$ a 5×10^7 ou inclusive valor muito menor de 3×10^5 frente a uma forte dissociação no meio, isso porque a xantana tende a apresentar agregação de diversas cadeias individuais (WHISTLER e BEMILLER, 1993; NUSSINOVITCH, 1997; PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

A sua estrutura ramificada e o alto peso molecular que apresenta conferem a xantana alta viscosidade inclusive em baixas concentrações, a qual diminui com o aumento da deformação do fluido pelo que a xantana apresenta um comportamento

pseudoplástico. A viscosidade das soluções praticamente não se vê afetada com as variações de temperatura e pH, mantendo esta característica em faixas de temperatura de 4 até 93 °C, e de pH entre 1 e 13, assim como também com forças iônicas equivalentes a concentrações de cloreto de sódio entre 0,05 e 1% (LIMA *et al.*, 2005).

4.4.4. Propriedades físicas da Xantana

O polissacarídeo que para uma bactéria é usado como proteção contra a dessecação, ou ataque de amebas, fagócitos e bacteriófagos, é para nós um produto capaz de formar soluções viscosas em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações (SOUZA e VENDRUSCOLO, 1999).

Das aplicações industriais e das muitas propriedades dos polissacarídeos em solução aquosa a xantana tem sido objeto de um grande número de estudos de estrutura e estudos físico químicos.

A estrutura da xantana confere um número de propriedades físicas ao polímero, as quais são utilizadas nas indústrias de alimentos entre outras. É estável em pH ácido ou alcalino e forma uma dispersão pseudoplástica em água. Concentrações relativamente baixas de polissacarídeo produzem soluções altamente viscosas e esta viscosidade não varia muito em elevadas temperaturas. Estas soluções são compatíveis com muitos outros ingredientes alimentícios realçando o sabor dos produtos. As técnicas utilizadas para determinar os atributos físicos do exopolissacarídeo junto com um completo conhecimento da sua estrutura química tem permitido a reunião de muita informação e proporciona um modelo excelente para outros exopolissacarídeos microbianos (SUTHERLAND, 2005).

Uma ampla faixa de valores propostos para o peso molecular da xantana provem em parte da aplicação de diferentes técnicas e também de tendências dos polissacarídeos para se agregar em solução (WHISTLER e BEMILLER, 1993; NUSSINOVITCH, 1997).

A xantana pode adotar um estado helicoidal duplo quando encontra-se em solução a baixas temperaturas e esta conformação causa a aparente inflexibilidade do

polissacarídeo na baixa temperatura ou em alta resistência iônica. (SUTHERLAND, 2005).

A viscosidade da goma xantana é afetada por fatores tais como o peso molecular da cadeia e o conteúdo de piruvato. O uso de goma xantana com peso molecular médio, como a obtida em laboratório, resulta em géis mais aceitos pelos consumidores comparados àqueles preparados com a goma xantana comercial. Estes géis serão como aqueles preparados com goma xantana de alto peso molecular, porém de baixa elasticidade, coesividade e mastigabilidade e por esse motivo são mais aceitos pelo consumidor (KIOSSEOGLOU *et al.*, 2003).

Soluções de biopolímeros com propriedades reológicas interessantes do ponto de vista industrial geralmente exibem propriedades pseudoplásticas, viscoelásticas além de elevada tensão residual. Entretanto, a determinação da viscosidade aparente (η_{ap}) em solução de baixa concentração é parâmetro mais simples para se avaliar o potencial de aplicação de um biopolímero (SILVA e RAO, 1999).

A viscosidade, diminuição de pseudoplasticidade e o valor de transição de gel flexível e pseudoplástico, estão diretamente relacionados com a concentração do polissacarídeo. Na concentração de 0.3% (p/v) de xantana, a adição de sais praticamente não tem um efeito mensurável, mas pode ser observado um crescimento da viscosidade em concentrações elevadas do polímero (SUTHERLAND, 2005).

4.4.5. Aplicações da Xantana

A goma xantana, biopolímero produzido por *X. campestris* é amplamente utilizada em diversos segmentos industriais devido as suas propriedades reológicas que superam as dos outros polissacarídeos disponíveis no mercado, propriedades de emulsificação, suspensão, estabilização e floculação (SWINGS, CIVEROLO e SUTHERLAND, 1993; QUINN, 1999).

Além de elevada viscosidade até em baixas concentrações, a goma xantana apresenta também boa estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH mesmo na presença de sais. A xantana é muito estável a diferentes valores de pH, sendo afetada só por valores superiores a pH 11 e inferiores a pH 2,5, dependendo da concentração; quanto maior a concentração, maior a estabilidade da solução. Este polissacarídeo é também muito estável a uma ampla faixa de temperatura (10 - 80 °C). Alimentos que contém goma xantana na sua composição e que recebem tratamentos de esterilização (120 °C/30min) perdem apenas 10% da sua viscosidade inicial (WHISTLER e BEMILLER, 1993; GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2005).

Na indústria petrolífera a goma xantana é o polímero mais utilizado em Recuperação Terciária de Petróleo (EOR), não tendo até o momento nenhum outro substituto em escala comercial que supere suas qualidades. A goma xantana tem sido usada junto com hidróxido de sódio e surfactantes na técnica conhecida como APS (álcali-polímero-surfactante) (NAVARRETE, 2000; NAVARRETE, 2001; NAVARRETE, SEHEULT e COFFEY, 2001).

Na indústria de alimentos a goma xantana tem adquirido grande importância, além do seu uso estar relacionado com a alteração das propriedades reológicas e a mudança de textura nos alimentos, está associada com melhoras nas propriedades de aroma, cor e sabor dos mesmos, sendo em comparação com outros polissacarídeos microbianos aquele que apresenta maiores benefícios. Por outro lado, a xantana previne que os alimentos se separem nas suas fases originais e permite que os produtos alimentícios conservem a estabilidade por um tempo maior (SUTHERLAND, 2005).

Conforme mencionado por Whistler e Bemiller (1993) e Nussinovitch (1997), a goma xantana tem também ampla utilização industrial em:

- *Indústria agrícola.* - formulações de fungicidas, herbicidas e inseticidas.
- *Indústria de produtos de limpeza.* - produtos altamente alcalinos para drenagem, produtos para limpeza de azulejos, soluções ácidas para remoção de oxido, etc.

- *Indústria de papel.* - ajudando na suspensão e estabilidade na manufatura do papel particularmente aquele destinado a contato direto com alimentos.
- *Indústria de cosméticos.* - elaboração de shampoos, sabonete líquido, pasta de dentes, géis e etc.
- *Indústria farmacêutica.* - estabilidade de emulções, cremes, antibióticos e etc.

4.4.6. Produção da Xantana

Na atualidade a xantana é um dos biopolímeros de maior produção comercial com uma produção anual de 20 000 a 50 000 toneladas correspondendo a um mercado global de cerca de US\$ 500 milhões por ano e que continua a crescer (WAITES, 2001; ROSALAM e ENGLAND, 2006; WYATT e LIBERATORE, 2009).

Os custos de produção são conduzidos pelo rendimento do polímero em relação a quantidade de fonte de carbono necessário, bem como por exigências de processamento. Em grande escala, estas exigências tem a ver com a dificuldade para manter o caldo altamente viscoso bem misturado, o qual aumenta os custos de produção (REHM, 2010).

Estudos de otimização do rendimento e produtividade dos processos fermentativos para produção deste polissacarídeo com elevadas propriedades funcionais e de interesse econômico, representam na atualidade um constante desafio.

A goma xantana é um polissacarídeo produzido durante o crescimento dos microorganismos do gênero *Xanthomonas* espécie *X. campestris*, onde a síntese da xantana está diretamente relacionada ao crescimento das bactérias no meio de cultura. Assim como na síntese de outros exopolissacarídeos bacterianos, a Xantana tem crescimento máximo durante a fase exponencial e mínimo na fase estacionária (SUTHERLAND, 2005).

Para a bactéria se reproduzir precisa de nutrientes específicos, incluindo micronutrientes como potássio, ferro e sais de cálcio e de macro nutrientes como carbono e nitrogênio, sendo a glicose e a sacarose as fontes de carbono utilizadas com

maior freqüência em concentrações geralmente de 2-4%, e como fontes de nitrogênio extrato de levedura, peptona, nitrato de amônio ou uréia em concentrações de 0,05-0,1%. Concentrações maiores destes substratos poderiam inibir o crescimento dos microorganismos (MORAINE e ROGOVIN, 1971; SOUW e DEMAIN, 1980; GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000; ROTTAVA, 2005).

O nitrogênio é um macro nutriente essencial, o qual pode ser fornecido ao meio por um componente orgânico assim como por uma molécula inorgânica. A relação existente entre carbono e nitrogênio na etapa de produção média é menor que a requerida durante a etapa de crescimento (GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000; PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

A formação da xantana por *X. campestris* é semelhante aos muitos outros sistemas de produção de exopolissacarídeos bacterianos, sendo favorecida pela alta proporção de fonte de carbono e limitados nutrientes como o nitrogênio. Geralmente o meio para a síntese de goma xantana no laboratório contem 0.1-0.2% de sais de amônio e 2-3% de glicose ou sacarose. A produção de goma xantana é maior quando as bactérias se desenvolvem num meio simples constituído de glicose, sais, fontes de nitrogênio, e melhorada com a adição de pequenas quantidades de ácidos orgânicos (FUNAHASHI, YOSHIDA e TAGUCHI, 1987; SUTHERLAND, 2005).

Atualmente a produção da goma xantana em escala industrial, tenta utilizar fontes de carbono alternativas visto que o uso de glicose e sacarose fazem com que o custo de produção deste polissacarídeo seja alto. O soro de leite apresenta resultados satisfatórios na produção deste polissacarídeo, uma vez que contem quantidades adequadas de nitrogênio, entre outros fatores propícios para produção de goma xantana por processo fermentativo com *X. campestris*.

A versatilidade nutricional de *X. campestris* é o maior atributo industrial na produção de xantana. Porém, a qualidade do biopolímero sintetizado em diferentes substratos pode variar consideravelmente quanto ao peso molecular, interferindo em suas características reológicas (SWINGS, CIVEROLO e SUTHERLAND, 1993).

As principais indústrias produtoras de xantana são Kelco (EUA), Rhône-Poulenc (França), Pfizer (EUA) e Mero-Rousselot-Satia (França) (LIMA *et al.*, 2005).

A produção e a aplicação de xantana têm sido extensamente estudadas também por diversos grupos de pesquisadores de universidades brasileiras. Estes estudos já resultaram em nove depósitos de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial; dentre estes, quatro patentes são relacionadas ao processo de produção (INDUSTRIAL, 2007).

4.4.6.1. Processo fermentativo para obtenção de goma xantana

O processo de produção da goma xantana a nível industrial consiste em diferentes etapas: inoculação, fermentação, remoção das células, precipitação, separação e secagem da goma.

No processo de produção da goma xantana, primeiramente, a cepa microbiana selecionada é preservada para possível estocagem por longo prazo através de métodos que mantenham as propriedades desejadas. Para produzir a goma xantana, culturas de *X. campestris* puras são cultivadas usando fermentação aeróbia submersa. O meio esterilizado composto de carboidratos, uma fonte de nitrogênio e sais minerais é inoculado com cultura selecionada, na escala piloto de fermentação, seguido por incubação a 27 – 30 °C por três dias em uma escala industrial de fermentação, e por um tratamento térmico para eliminar micro-organismos viáveis. O crescimento dos micro-organismos e a produção de goma xantana são influenciados por fatores tais como o tipo de bioreator usado, o modo de operação (batelada ou contínuo), a composição do meio, as condições da cultura (temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido) (GARCÍA OCHOA, CASTRO e SANTOS, 2000; CHI e ZHAO, 2003).

Em quanto a temperatura, a maioria dos autores coincidem em valores entre 27 – 30 °C na produção de goma xantana (SHU e YANG, 1990; GUPTA e KAMAT, 1997; GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000).

Sobre o pH, os autores concordam em reportar valor de pH neutro (7,0) como ótimo para o crescimento de *X. campestris*; o pH deve ser controlado durante todo o processo de fermentação, já que devido à formação de ácidos orgânicos durante a produção decresce até valor de pH 5.0. Frente a essa situação, alguns autores recomendam a utilização de álcalis como KOH, NaOH e $(\text{NH})_4\text{OH}$ para manter a neutralidade do meio. Alguns dos estudos demonstram que mantendo o adequado controle de pH, a produção da xantana culmina ao atingir a fase de crescimento estacionário, efeito que acontece independente ao uso de álcalis para o controle de pH. No entanto, quando o pH não é controlado a produção de goma continua ainda na fase de crescimento estacionário, com baixas na qualidade da mesma. No que se refere à agitação, visto que a *Xanthomonas* é aeróbia, no processo de produção do polissacarídeo é necessário contar com parâmetros de agitação para evitar condições de anaerobiose pelo incremento da viscosidade do meio; a velocidade de agitação está diretamente relacionado com a produção, composição química, crescimento celular e características reológicas da goma (SUTHERLAND, 2005).

Na produção da xantana é preciso a presença de oxigênio no meio, e como durante o processo a viscosidade aumenta, o oxigênio é rapidamente consumido. Porém, para cultivar satisfatoriamente as bactérias no fermentador é necessário uma vigorosa aeração. A presença de polissacarídeo no meio de fermentação pode afetar também a disponibilidade de substratos de carbono como glicose e sacarose, por interação com estes carboidratos (SUTHERLAND, 2005).

García Ochoa, Santos e Alcón, (1995) mostraram que quando a velocidade de agitação é muito baixa, a produção da goma diminuía já que com o incremento da viscosidade no meio a transferência de oxigênio é menor, e quando a velocidade de agitação era maior a 500 rpm, a produção de goma também era baixa, uma vez que as células viram-se afetadas pela intensidade da agitação mecânica.

Em relação ao tempo de fermentação na produção de xantana, os diferentes trabalhos coincidem em reportar tempos de fermentação entre 48 e 96 horas (GARCÍA

OCHOA, SANTOS e ALCÓN, 1995; GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000; NITSCHKE, RODRIGUES e SCHINATTO, 2001; BORGES e VENDRUSCOLO, 2008; SILVA *et al.*, 2009; PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

Em relação ao equipamento utilizado, o fermentador deve ter o desenho adequado para um meio de elevada viscosidade que permita a homogeneidade no tanque, e o adequado fornecimento de oxigênio às células. (GARCÍA, QUINTERO e LÓPEZ, 2004).

Posterior ao processo de obtenção, o produto é resfriado e a goma xantana é precipitada em solvente, (isopropanol, etanol ou acetona), ou mediante sais de amônia quaternárias. Recentemente tem-se proposto a ultrafiltração como uma operação unitária que representa grandes vantagens no processo de recuperação. Com a finalidade de conferir certas características especiais ao produto final, o polissacarídeo pode ser tratado química, física ou biologicamente durante sua recuperação. Para aumentar sua viscosidade por exemplo, trata-se com formaldeído, e para ele ser compatível com outros polissacarídeos trata-se com celulasas. O produto recuperado finalmente é secado, moído, peneirado e então embalado (GARCÍA OCHOA, CASTRO e SANTOS, 2000; CHI e ZHAO, 2003; SUTHERLAND, 2005).

4.4.6.2. Substratos utilizados na obtenção de goma xantana

O conhecimento das necessidades nutricionais de uma linhagem é estudo de vital importância, objetivando o fornecimento dos nutrientes apenas necessários, por questões econômicas do processo produtivo. Algumas características também devem ser consideradas, como: não provocar problemas na recuperação do produto, não causar dificuldades no tratamento final do efluente, ter composição razoavelmente fixa e os componentes devem ser estáveis, permitindo armazenamento prolongado (SCHMIDELL, 2001).

Geralmente, classificam-se os meios de cultivo como meio químico definido e meio complexo. Meio químico definido é o meio cuja composição química é qualitativa e quantitativamente conhecida, podendo ser reproduzida a qualquer instante (SCHMIDELL, 2001). Alternativamente, para suprir as necessidades de linhagens mais

exigentes e, em geral, com características nutricionais não tão conhecidas, pode-se adicionar certos materiais complexos. Estes são chamados de meios complexos, sendo compostos de nutrientes como extrato de levedura, de carne ou de planta ou de produtos de digestão protéica dessa ou de outras fontes (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005). Esses materiais (individualmente ou adicionados conjuntamente) permitem introduzir no meio de cultura os fatores ausentes em um meio definido, mas, além de onerosos, são complexos e de composição variável ao longo do tempo de armazenagem. Também a dependência do fornecedor e qualidade variável dos lotes são fatores de restrição (SCHMIDELL, 2001).

No laboratório são utilizados geralmente substratos puros como glicose e sacarose, mais a nível industrial são utilizados diferentes substratos. Os substratos industriais devem ser baratos, abundantes em fonte de carbono e frequentemente acrescentados de alguma fonte de nitrogênio. É preciso que os meios selecionados sejam aceitáveis para uso alimentício (SUTHERLAND, 2005).

Dentro dos meios mais complexos, pode-se mencionar o uso de matérias-primas naturais, tais como caldo de cana-de-açúcar, farinhas diversas (trigo, milho, soja, cevada), água de maceração de milho, entre outros. Como a composição química dependerá de uma série de fatores, tais como solo, variedade do vegetal, safra, clima, processamento e estocagem, freqüentemente é necessária a adição de alguns sais, particularmente contendo nitrogênio e fósforo. Esse fato indica que podem ocorrer oscilações no processo fermentativo que emprega essas matérias-primas, obrigando as empresas produtoras a manterem instalações piloto para o ajuste da composição do meio a cada novo lote de matéria-prima que a empresa recebe (KENNEDY *et al.*, 1982; SCHMIDELL, 2001).

Para produção de xantana, o meio padrão deve conter fontes de nitrogênio, de carbono, íons fosfato e magnésio, e alguns elementos traço, sendo atribuído o custo de 20 a 30% ao processo total (BORN, LANGENDORFF e BOULENGUER, 2003). Diversos trabalhos mostram a relação entre meio de cultivo (definido, complexo e meio

adicionado de matérias-primas naturais) e a produção de xantana, composição química e comportamento reológico. Souw e Demain (1979), realizaram um estudo nutricional de produção de xantana em meio químico definido, sendo testados como fonte de carbono a sacarose, a frutose e a xilose; como fonte de ácidos orgânicos o piruvato, o succinato e o cetoglutarato e como fontes de nitrogênio, aminoácidos, sais de amônio, nitrato de sódio e uréia. Diferentes fontes de nitrogênio (água de maceração de milho, farinha de soja, peptona, extrato de levedura e resíduos de destilarias) para produção de xantana por *X. campestris* IC19 e sua influência na viscosidade e composição química do polímero foram avaliados por Kennedy *et al.* (1982).

O efeito da fonte de carbono (glucose, sacarose, melão e sirodex A – xarope de glicose) e fonte de nitrogênio (água de maceração de milho em substituição ao $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) na produção e características físico-químicas da xantana produzida por *X. campestris* NRRL B-1459 foi relatado por De Vuyst e A, (1994). Gupte e Kamat, (1997) avaliaram a influência de diferentes fontes de carbono (glucose, sacarose, lactose e amido), nitrogênio (extrato de levedura, peptona, uréia, água de maceração de milho, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 e extrato de levedura + peptona) e sais inorgânicos (FeCl_3 , NaCl , citrato, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4) sobre a produção e características reológicas da goma xantana por *X. campestris* ICa-125. Outros meios utilizados na produção de xantana são, soro de leite (KONÍČEK e KONÍČKOVÁ-RADOCHOVÁ, 1992; ANTUNES *et al.*, 2000; NITSCHKE, RODRIGUES e SCHINATTO, 2001; BARRETO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; SAVVIDES, KATSIFAS e HATZINIKOLAOU, 2012), resíduos cítricos (GREEN, SHELEF e BILANOVIC, 1994), resíduos de batata (BILANOVIC *et al.*, 2011), resíduo de polpa de beterraba (YOO e HARCUM, 1999), resíduos de azeitona (LOPEZ e RAMOS, 1996), melado (KALOGIANNIS *et al.*, 2003), resíduos agrícolas (MORENO *et al.*, 1998; LÓPEZ *et al.*, 2004), amido (ROSALAM e ENGLAND, 2006), fermentação em meio sólido (STREDANSKY e CONTI, 1999).

Para uma ótima síntese de xantana é preciso um balanço entre o carbono utilizável e as fontes de nitrogênio adicional ao carboidrato, o qual pode modificar a

consistência na produção e qualidade do produto. Muitas vezes, a qualidade da xantana produzida em diferentes substratos, seja usando meios de cultivo definidos ou complexos, pode variar consideravelmente o peso molecular e portanto as características reológicas da xantana sintetizada (SUTHERLAND, 2005).

4.4.6.2.1. Soro de queijo

O soro de queijo (Figura 3), chamado também de lactossoro ou soro lácteo é o subproduto líquido separado do leite no processo de elaboração de queijo, constituído por todos aqueles componentes do leite que não se integram na coagulação da caseína (SPREER, 1998).

Durante muito tempo este subproduto industrial não era aproveitado pela indústria, sendo geralmente destinado para alimentação animal geralmente de suínos e muitas vezes jogado nas águas de rios e lagos, dando lugar a problemas graves de poluição ambiental. Ao ser jogado nas águas de rios e lagos precisa de oxigênio para sua decomposição, com uma demanda bioquímica de oxigênio - DBO5 de 40 a 60 g/L e uma demanda química DQO de 50 a 80 g/L aproximadamente, o que afeta em alto grau a vida tanto animal como vegetal nessas águas, pois caso o lote jogado precise de todo o oxigênio presente nas águas durante o processo de putrefação, nenhum tipo de vida pode persistir. Assim, a quantidade de soro a ser eliminado nas águas de rios e lagos tem que ter uma relação lógica com o conteúdo de oxigênio presente nas águas (SPREER, 1998).

Algumas empresas, ao invés de purificar o soro antes de ele ser eliminado nos rios e lagos preferem eliminar grandes quantidades de soro nas chácaras próximas as instalações de processamento, e assim economizar na elaboração de módulos especiais de purificação. Isso poderia se tornar em um método de benefício tanto para a empresa, quanto para o agricultor, sempre que a freqüência de eliminação das águas nos terrenos seja a correta e que o espaço ao redor seja o suficientemente grande e distante da área urbana, o qual nem sempre acontece (FAO, 1978).

O soro representa perto dos 90% do volume total do leite e contém a maioria dos compostos hidrossolúveis deste sendo 95% da lactose, 25% das proteínas e 8% da matéria graxa do leite. Geralmente, a composição do soro depende da procedência do leite e do tipo de queijo elaborado, que pode ser soro ácido com pH de 5.1, gerado da elaboração de queijos coagulados com ácidos, como o queijo cottage, ou soro doce com pH de 5.6, gerado da elaboração de queijo coagulados com renina, como o queijo Cheddar (VALENCIA e RAMIREZ, 2009).



Figura 3 - Soro de queijo

a) Composição do soro de queijo

A Tabela 1, mostra a composição média do soro de queijo segundo o tipo ao qual ele pertence:

Tabela 1 - Composição porcentual média de soro de queijo dos diferentes processos comerciais

Constituinte	Caseína	Soro	Soro Doce (%)	Soro Ácido (%)
	Renina (%)	Lactato (%)		
Matéria seca	7,08	6,58	7,00	6,50
Lipídeos	0,51	0,09	0,20	0,04
Lactose	5,18	4,53	4,90	4,40
Nitrogênio Total	0,15	0,12	0,13	0,11
Ácidos (lático e cítrico)	0,16	0,78	0,20	0,05
Cinzas	0,53	0,07	0,50	0,80

Fonte: CHANDAN R. 2008.

O soro representa de 85 a 95% do volume de leite total utilizado na elaboração do queijo, mantendo cerca de 55% do total de nutrientes do leite, contendo de 65g/L até 70g/L de proteínas, de 45g/L até 50g/L de lactose e porcentagens menores de minerais (SISO, 1996; PANESAR *et al.*, 2007; CHANDAN, KILARA e SHAH, 2008).

A grande maioria dos processamentos do soro de queijo tem a finalidade de obtenção de proteína, já que conserva cerca de 20% de um total de 80% de caseína contida no leite. Esta proteína é geralmente definida como a proteína precipitada a pH 4.6, propriedade que é de importância na fabricação de queijo. O soro de queijo é mais heterogêneo que a caseína, está constituído predominantemente de beta-lactoglobulina e alfa-lactoalbumina. Outras proteínas do soro de queijo presentes em quantidades menores são albuminas, imunoglobulinas (por exemplo, IgA, IgG, IgM), peptonas de protease, lactoferrina e transferrina, cada uma delas com características únicas. Concentrados de proteínas do soro de queijo e isolados, são utilizados como ingredientes em ampla gama de formulações de alimentos (MCBEAN, MILLER e JARVIS, 2007).

Outro componente de porcentagem elevada no soro é a lactose com cerca de 25%. Este é um açúcar redutor cuja estrutura consiste de galactose e glicose com ligação de um β 1-4 glicosídico, cujo nome sistemático é β -O-D-galactopyranosyl-(1-4)- α -D-glucopyranose (α -lactose) ou β -O-D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranose (β -lactose). É o principal carboidrato do leite, representando 54% do total dos sólidos não graxos presentes no leite, e contribui com 30% da energia (calorias) total dada pelo leite (FOX e MCSWEENEY, 1998).

A lactose tem um papel muito importante no leite e nos produtos derivados uma vez que é um componente essencial na produção de produtos fermentados do leite, faz parte do valor nutritivo do leite e derivados e causa alterações de cor e sabor em produtos de leite tratados com aquecimento intenso (FOX e MCSWEENEY, 1998).

A produção mundial de queijo é de aproximadamente $1,4 \times 10^7$ toneladas anuais, e o soro gerado na elaboração deste, contém aproximadamente 6×10^6 toneladas de

lactose, desta produção de lactose, só 7% é potencialmente aproveitado (HORTON, 1993; FOX e MCSWEENEY, 1998).

A lactose assim obtida é utilizada pela indústria de alimentos e indústria farmacêutica. Um dos usos em processos industriais é como substrato ou fonte de carbono para crescimento de bactérias na produção de polissacarídeos, sendo um deles a goma xantana gerada pela *X. campestris* e que tem ampla aplicabilidade na indústria de alimentos. A utilização deste açúcar na produção de xantana é bastante viável, considerando que está contida num substrato disponível e de baixo custo como é o soro de queijo (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006).

b) Produção do soro

Para cada quilograma de queijo produzido são gerados nove litros de soro. Uma planta produtora de queijo pode gerar cerca de um milhão de litros de soro diariamente (ONWULATA e HUTH, 2008).

A produção e projeção de produção de queijo no Brasil (Soro - Lactose) são apresentados na Tabela 2 e Figura 4, onde se observa a tendência de aumento na produção para os próximos anos (MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, 2009).

Tabela 2 - Dados estimados de produção e projeção de produção de queijo (Soro - Lactose)

Ano	Queijo (mil ton)	Soro (mil ton)	Lactose (mil ton)
2009	614	5526	221
2010	648	5832	233
2011	669	6022	241
2012	695	6252	250
2013	720	6482	259
2014	746	6712	268
2015	771	6942	278

Fonte: MAPA, 2009.

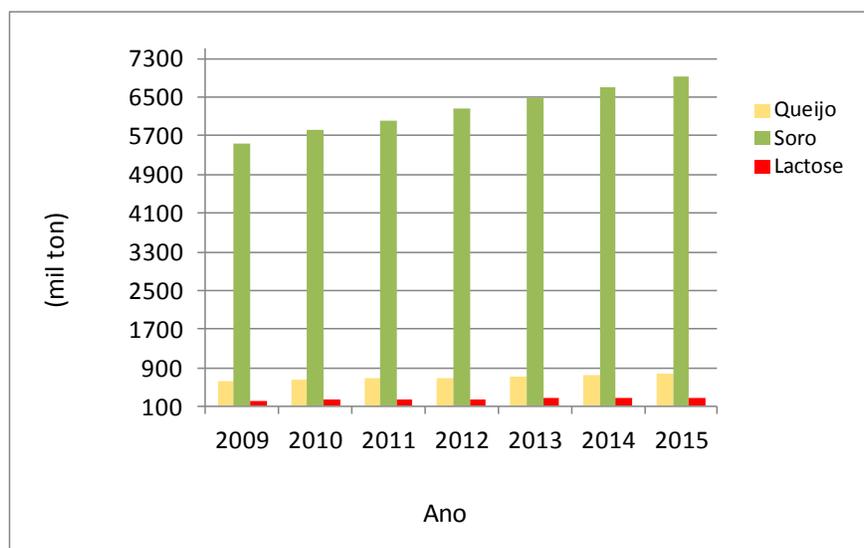


Figura 4 - Dados e projeção da produção de queijo (Soro-Lactose) Brasil 2009.

Na atualidade o soro de queijo é considerado como matéria-prima e nos últimos anos a indústria tem desenvolvido diferentes alternativas de recuperação dos nutrientes de elevada qualidade contidos nele. Assim, a indústria de alimentos aproveita os componentes do soro na produção de:

- Bebidas Isotônicas - dirigidas a crianças, esportistas e mulheres grávidas, para controlar a sede, reposição de eletrólitos e prover energia.
- Obtenção de proteínas - utilizadas na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos no mesmo processo de produção de queijos, panificação, produtos dietéticos, produtos cárneos.
- Obtenção de Lactose - utilizada na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica para elaboração de produtos diuréticos, dietéticos, penicilina e outros antibióticos (VEISSEYRE e VENTANAS, 1988; SPREER, 1998)

Por processos fermentativos obtenção de etanol, bebidas alcoólicas e biopolímeros microbianos, o que permite revalorizar este subproduto industrial ao mesmo tempo que se reduz consideravelmente a concentração de lactose no soro, resolvendo o delicado problema de poluição ambiental (VEISSEYRE e VENTANAS, 1988; SPREER, 1998; DRAGONE *et al.*, 2009).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. MATERIAL

5.1.1. Micro-organismo

O microorganismo utilizado foi a linhagem de *X. campestris* ATCC 13951, obtida da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello.

5.1.2. Meio de crescimento e manutenção do Micro-organismo

A bactéria foi mantida em meio Agar Nutriente da marca OXOID preparado conforme as especificações da embalagem.

5.1.3. Meio de cultura e reagentes

O meio de cultura utilizado foi soro de queijo, este foi adquirido em pó da empresa Alibra cuja composição é mostrada na Tabela 3, foi reconstituído a diferentes concentrações com água destilada, e acrescentado de extrato de levedura e sulfato de amônio e/ou uréia como fontes de nitrogênio.

Tabela 3 - Composição do meio de cultura utilizado

Meio de cultura	
Soro de Queijo	Valores médios
Aspecto	Pó uniforme sem grumos
Cor	Branco a amarelado
Sabor	Sabor lácteo, levemente salgado
Umidade (%)	Máx. 3,0
Gordura (%)	Máx. 1,5
Proteínas (%)	Min. 10
Acidez (% Ác. Lático)	Máx. 2,5
pH (solução 10%)	6,0 a 7,0
Teor de cinzas (%)	Máx. 8,0
Bolores e leveduras	< 50
Contagem de mesófilos (UFC/g)	< 50.000
Staphylococcus aureus (UFC/g)	< 100
Coliformes totais (UFC/g)	< 10
Coliformes Termotolerantes (UFC/g)	< 10
Salmonella SP	Ausente em 25g

Fonte: Alibra 2012.

O soro a ser utilizado foi desproteinado e hidrolisado, sendo que após ser diluído foi corrigido o pH para 4,3 com HCl 2N, levado a ebulição e resfriado a temperatura ambiente como mostrado na Figura 5.

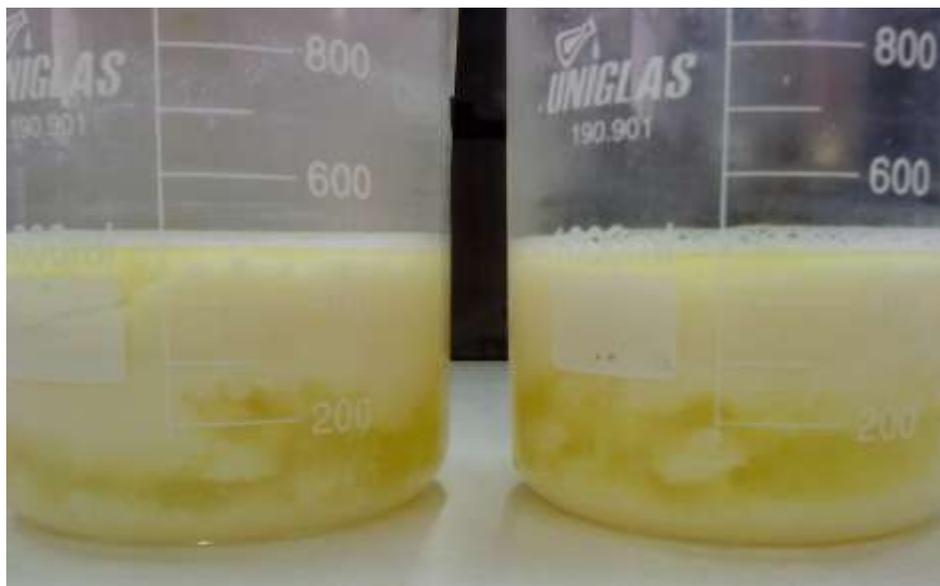


Figura 5 - Separação da proteína do soro

Posteriormente, o soro foi filtrado a vácuo para separação da proteína, a proteína obtida foi desprezada e o meio desproteinado utilizado como meio de cultura, o qual foi acrescentado de extrato de levedura e sulfato de amônio ou uréia como fontes de nitrogênio, para avaliação e comparação dos melhores resultados.

5.1.4. Meio para preparo do pré-inoculo

O meio para o pré-inoculo foi constituído de glicose (50g/L); KH_2PO_4 (5g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2g/L); citrato de sodio (2.3g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2g/L); H_3BO_3 (0.006g/L) e extrato de levedura (5g/L).

5.1.5. Meio para preparo do inoculo para fermentação

O meio utilizado para inoculo foi preparado em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 80 mL de soro de leite, extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou ureia, em diferentes

concentrações e acrescentados de 10 mL de solução de sais (KH_2PO_4 20g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L, ZnSO_4 2g/L).

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Testes preliminares

Inicialmente foram feitas fermentações utilizando como meio soro de queijo desproteinado sem hidrolizar. Os frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio foram incubados em Shaker (TECNAL mod TE 421) a 29°C e 180 rpm com amostragens em 24, 48 e 72 horas de fermentação.

Realizaram-se diferentes testes preliminares com meio hidrolisado com intenção de determinar os parâmetros a serem utilizados posteriormente, e ajustar corretamente o processo fermentativo para depois poder aplicar o planejamento experimental e avaliar a significância de cada uma das variáveis no processo.

5.2.2. Preparo do meio para manutenção do micro-organismo

O meio Agar Nutriente após diluído em água destilada e homogenizado completamente com aquecimento até ebulição. Em seguida foi adicionado 10 mL em tubos, os quais foram esterilizados a 121°C por 15 min. Os tubos inoculados posteriormente em meio aséptico com o microorganismo *X. campestris* ATCC 13951 foram incubados por 72 horas, a temperatura de 30°C e conservados em refrigeração a 4°C. Para melhores resultados no processo fermentativo o microorganismo foi repicado a cada 30 dias.

5.2.3. Preparo do soro de queijo desproteinado e hidrolisado.

Uma amostra de 150 g de soro de queijo em pó foi dissolvida em água, completando-se o volume para 1L. O pH foi ajustado para pH 4,3 e, após aquecimento até 93 °C para precipitação das proteínas, o soro foi filtrado e o pH novamente ajustado para pH 7,0.

Para a preparação do meio de cultura, o soro desproteinado foi diluído com água destilada, de forma que obteve-se concentração inicial de lactose nos meios de 133, 116, 89, 62 e 44 g/L, para atender ao planejamento experimental inicialmente proposto.

Os frascos contendo os meios nas diferentes concentrações foram hidrolisados com adição de 600 mg de enzima lactase para cada frasco, que foram mantidos em banho-maria a temperatura de 37 °C por 120 min.

5.2.4. Métodos analíticos - Meio de cultura

5.2.4.1. Determinação da concentração de lactose pelo método Fehling.

O conteúdo de lactose do soro desproteinado foi determinado através do método Fehling para o qual foi preparada:

- Solução Fehling A: 34,65 g de sulfato de cobre foram dissolvidos em água destilada para 500 mL.
- Solução Fehling B: 173 g de tartarato de sódio e 125 g de KOH foram dissolvidos em água destilada para 500 mL.

Em frascos de Erlenmeyer foram colocados 10 mL da solução A e 10 mL da solução B, seguido de homogeneização, e adição de três gotas de solução de azul de metileno.

A mistura de soluções preparada foi titulada com soro de queijo desproteinado a quente, até que se obtivesse coloração vermelho tijolo, anotando-se o volume gasto. As análises de lactose no soro de queijo foram feitas em triplicata.

5.2.4.2. Determinação de glicose no meio hidrolisado

Foram colocados em tubos 2mL de reagente para teste de glicose acrescentado de 20 µl de amostra (soro de queijo desproteinado, hidrolisado). Preparou-se um tubo branco contendo água destilada no lugar do soro e outro tubo padrão contendo solução de glicose 1 g/L, conforme instruções do fabricante do reagente glicose enzimático

colorimétrico. Os tubos foram levados em banho a 37 °C durante 10 min e, após resfriados, foram feitas leituras de absorvância em espectrofotômetro HACH modelo DR/4000U em 505 nm. As análises de determinação de glicose foram feitas em triplicata.

5.2.4.3. Determinação de nitrogênio total no meio substrato

Para determinação da concentração de nitrogênio total do soro de queijo desproteinado foi utilizado o Test N Tube™ Vials método 10072 para determinação de Nitrogênio Total HR (10 – 150 mg/L N).

5.2.5. Métodos de cultivo

5.2.5.1. Pré-inóculo

Frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio previamente esterilizados a 121°C por 15 min, foram inoculados com alça de cultura do micro-organismo em meio semi sólido e incubados em condições de 29 °C, 180 rpm.

5.2.5.2. Fermentação em frascos de Erlenmeyer

Frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 80 mL de meio previamente esterilizados a 121°C por 15 min, foram hidrolisados, inoculados com 10 mL do pré-inóculo, 10 mL de sais também esterilizadas a 121°C por 15 min e o pH do meio foi corrigido a pH 7. A fermentação dos frascos foram feitas em Shaker (TECNAL mod TE 421) a 29 °C e 180 rpm com amostragens em 24, 48 e 72 horas de fermentação.

Do meio de fermentação foram retirados 20 mL de amostra a cada 24 horas para determinação de pH, produção de goma xantana, produção de biomassa e lactose consumida. Todas as análises realizadas aos meios foram feitas em triplicata.

5.2.6. Otimização da produção de goma xantana através de Delineamento central composicional rotacional (DCCR)

Para o estudo da influência das variáveis de processo na produção de goma xantana foi utilizado um planejamento experimental 2^3 completo, com tres pontos centrais (nível 0) e seis pontos axiais (níveis $\pm \alpha$) totalizando 17 ensaios, onde as variáveis independentes foram: concentração de lactose, concentração de extrato de levedura e concentração de sulfato de amônio ou uréia. As respostas estudadas foram: goma xantana produzida (g/L), produção de biomassa (g/L) e lactose consumida (g/L).

A Tabela 4 apresenta os valores utilizados para cada uma das variáveis no planejamento.

Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR para três fatores.

Variáveis (g/L)	código	-1,68	-1	0	1	1,68
Lactose	X ₁	44,00	62,00	89,00	116,00	133,00
Ext. Levedura	X ₂	3,00	3,81	5,00	6,19	7,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	X ₃	0,625	1,00	1,50	2,00	2,375
Uréia	X ₃	1,00	1,40	2,00	2,60	3,00

O delineamento experimental assim como as faixas de cada variável estudada estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição dos meios de cultura para produção de goma xantana por *X. campestris* ATCC 13951 - DCCR para concentrações de lactose, extrato de levedura, sulfato de amônio e/ou uréia.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis em (g/L)			
	Lactose	Ext. Lev.	Fonte de nitrogênio	Lactose	Ext. Lev.	Fontes de nitrogênio	
						Sulf. Amônio	Ureia
1	-1	-1	-1	62	3,81	1,00	1,40
2	1	-1	-1	116	3,81	1,00	1,40
3	-1	1	-1	62	6,19	1,00	1,40
4	1	1	-1	116	6,19	1,00	1,40
5	-1	-1	1	62	3,81	2,00	2,60
6	1	-1	1	116	3,81	2,00	2,60
7	-1	1	1	62	6,19	2,00	2,60
8	1	1	1	116	6,19	2,00	2,60
9	-1,68	0	0	44	5,00	1,50	2,00
10	1,68	0	0	133	5,00	1,50	2,00
11	0	-1,68	0	89	3,00	1,50	2,00
12	0	1,68	0	89	7,00	1,50	2,00
13	0	0	-1,68	89	5,00	0,63	1,00
14	0	0	1,68	89	5,00	2,38	3,00
15	0	0	0	89	5,00	1,50	2,00
16	0	0	0	89	5,00	1,50	2,00
17	0	0	0	89	5,00	1,50	2,00

5.2.7. Comprovação do meio de cultura otimizado para produção de goma xantana por *X. campestris* ATCC 13951.

Para comprovar o melhor resultado obtido através do planejamento DCCR, foi feito um ensaio com três repetições, utilizando o meio de composição indicada pelo conforme a Tabela 6.

Tabela 6 - Composição do meio de cultura para validação da produção de goma xantana por *X. campestris* ATCC 13951.

Componente	Concentração
Lactose (g/L)	44
Extr. Levedura (g/L)	3,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ /Ureia (g/L)	1,5/2,0

5.2.8. Métodos analíticos - Meio fermentado

5.2.8.1. Determinação da biomassa seca

Para determinação da massa celular seca produzida, 10 mL do meio fermentado foram diluídos com 50 mL de água destilada, para reduzir a viscosidade do mesmo e permitir a decantação das células bacterianas, já que a alta viscosidade dificulta a remoção da biomassa do caldo (KENNEDY e BRADSHAW, 1984). Dez mL de cada amostra diluída foram centrifugados em centrífuga CENTRIBIO modelo 80 2B a 2300 g por 20 minutos. O primeiro sobrenadante obtido foi reservado para posteriores análises de goma e açúcar remanescente. A massa celular obtida foi lavada duas vezes com água destilada e centrifugada nas mesmas condições, seguindo-se secagem em estufa a vácuo a 110 mm Hg e 60 °C até peso constante. Os resultados representam a média de triplicata.

5.2.8.2. Recuperação da goma xantana do meio fermentado

Do primeiro sobrenadante obtido da centrifugação dos meios foram tomados 5 mL de cada ensaio, aos quais foram acrescentados etanol 99,5 °GL até a precipitação da goma (GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000). Uma vez separada do líquido, a mesma foi secada em placa de Petri em estufa a vácuo a 110 mmHg e 65 °C, até peso constante. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Dependendo do tempo de fermentação foi necessário aumentar o volume de álcool utilizado para precipitação, sendo que para 24 horas de fermentação adicionou-se 12 mL de álcool, para 48 horas 15 mL e para 72 horas 20 mL.

5.2.8.3. Determinação do pH

A determinação do pH, foi feita por leitura direta em potenciômetro digital Digimed, modelo DM 20.

5.2.8.4. Determinação de glicose no meio fermentado

Para determinação de glicose foi utilizado o teste enzimático colorimétrico. Foram colocados 2mL de reagente enzimático colorimétrico em tubos de ensaio e 20 µl do primeiro sobrenadante. Para o preparo do branco utilizou-se água deionizada e para

o padrão solução de glicose 1 g/L. Todos os tubos foram incubados em banho a 37 °C durante 10 minutos e as leituras de absorvância em espectrofotômetro HACH, modelo DR/4000U a 505 nm, em triplicata.

5.2.9. Curvas de produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida no meio

Com a finalidade de analisar o crescimento celular e consumo de substrato em relação a produção de goma foram realizadas amostragens ao longo do tempo de fermentação em frascos de Erlenmeyer. As amostragens foram feitas a cada 24 horas por um periodo de 3 dias, onde para cada intervalo de tempo foram retirados 20 mL de amostra para análise da produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. ANÁLISE DA MATERIA-PRIMA

O meio de soro de queijo desproteinado utilizado apresenta concentração de lactose de 133 g/L e nitrogênio total 98 g/L.

6.2. TESTES PRELIMINARES

Nos testes preliminares utilizando como meio soro de queijo desproteinado sem hidrolizar, as análises realizadas nos diferentes tempos mostraram que não era possível separar totalmente a goma produzida da massa celular após a centrifugação, ficando sempre parte de goma junto com a biomassa, o que não permitiu a determinação da produção real de goma utilizando este meio. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos.

Tabela 7 - Produção de goma e biomassa em 24, 48 e 72 h de fermentação em meio soro de queijo desproteinado sem hidrolizar, suplementado com extrato de levedura

Tempo (h)	Goma (g/L)	Biomassa (g/L)
24	5,280	3,450
48	7,830	3,820
72	9,840	3,940

A quantidade e a qualidade de goma xantana produzida em uma cultura de batelada variam com a composição do meio e os parâmetros do meio, e com as condições de fermentação (GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000).

Realizaram-se também fermentações do soro de queijo desproteinado e hidrolizado com valores de pH inicial abaixo de 7, mas após 72 horas de fermentação não se obteve produção de goma. Garcia Ochoa (*et al.*, 2000) mostraram que para o

crescimento do *X. campestris*, os melhores intervalos de pH encontram-se entre pH 6,0 a 7,5 e para a produção da goma xantana e qualidade do polímero os melhores intervalos de pH estão entre 7,0 – 8,0.

6.3. FERMENTAÇÃO DE SORO DE QUEIJO DESPROTEINADO

Para o processo de produção de goma foi utilizado como meio soro de queijo desproteinado e hidrolisado, acrescentado de extrato de levedura e sulfato de amônio ou uréia como fontes de nitrogênio, cujas concentrações foram estudadas através de Delineamento composto central rotacional DCCR de 3 variáveis com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central totalizando 17 ensaios. Os ensaios ocorreram a 29 °C, 180 rpm e pH inicial 7, com base em resultados da literatura. Garcia Ochoa (*et al.*, 2000) mostraram valores de temperatura de 25 °C a 27 °C para o ótimo crescimento do *X. campestris*, no entanto para a produção e melhor qualidade da goma xantana a melhor faixa de temperatura e de 25 °C – 30 °C.

Shu e Yang (1990), concluíram que maiores rendimentos de goma xantana podem ser obtidos com fermentações realizadas em uma faixa de temperatura de entre 27 °C e 30 °C.

Segundo Gupte e Kamat (1997), no seu estudo com *X. campestris* ICa-125, as maiores concentrações de exopolissacarídeo extracelular ocorreram na temperatura de 32 °C. Porém, nesse estudo foram testadas apenas as temperaturas de 25 °C, 32°C, 35 °C e 38 °C, obtendo-se 4,2; 9,0; 8,7 e 3,6 g.L⁻¹, respectivamente.

6.3.1. Otimização da produção de goma xantana através de Delineamento composto central rotacional em meio constituído de soro de queijo desproteinado, extrato de levedura e sulfato de amônio

A Tabela 8 apresenta a matriz dos ensaios com os valores das variáveis em g/L, assim como das respostas produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida, para o meio constituído de soro de queijo desproteinado, extrato de levedura e sulfato de amônio, em tempos de fermentação de 24 h, 48 h e 72 h.

Tabela 8 - Produção de goma xantana por *X. campestris* utilizando soro de queijo desproteinado suplementado com sulfato de amônio; biomassa produzida e lactose consumida (g/L).

Ensaio	X1*	X2*	X3*	Goma 24h	Biomassa 24h	Lact. Cons. 24h	Goma 48h	Biomassa 48h	Lact. Cons. 48h	Goma 72h	Biomassa 72h	Lact. Cons. 72h
1	62,0	3,81	1,0	5,04	2,76	22,03	13,62	5,16	36,47	17,58	5,26	47,76
2	116,0	3,81	1,0	7,02	2,88	55,08	13,80	6,00	65,37	18,48	6,10	73,17
3	62,0	6,19	1,0	3,84	3,28	22,64	12,00	5,22	37,63	18,24	5,06	47,59
4	116,0	6,19	1,0	6,00	2,70	54,78	12,00	6,60	66,55	18,00	7,86	71,65
5	62,0	3,81	2,0	5,34	3,36	23,93	13,98	5,48	37,89	17,70	2,42	51,46
6	116,0	3,81	2,0	5,22	2,94	52,53	11,16	6,44	64,53	17,22	7,22	68,40
7	62,0	6,19	2,0	3,66	2,60	25,17	6,72	6,16	34,83	13,80	6,40	47,01
8	116,0	6,19	2,0	6,06	2,84	54,40	7,56	6,96	62,68	13,98	7,70	65,65
9	44,0	5,0	1,5	6,48	3,88	12,27	12,36	4,52	27,93	13,68	4,26	40,15
10	133,0	5,0	1,5	8,16	3,10	62,00	11,40	6,16	73,23	11,34	7,68	78,28
11	89,0	3,0	1,5	7,32	3,72	34,67	13,38	5,70	46,50	17,64	5,60	59,85
12	89,0	7,0	1,5	6,00	3,96	32,79	10,44	6,52	44,60	12,72	8,92	50,82
13	89,0	5,0	0,63	7,86	4,00	36,64	14,16	5,90	49,46	17,70	6,20	62,99
14	89,0	5,0	2,38	6,84	4,12	33,68	10,86	6,28	44,48	12,90	8,08	53,45
15 (C)	89,0	5,0	1,5	7,08	3,50	31,89	11,04	6,06	42,35	12,36	7,74	49,75
16 (C)	89,0	5,0	1,5	5,64	2,48	38,54	10,44	5,46	44,76	12,48	8,00	53,29
17 (C)	89,0	5,0	1,5	5,10	2,96	39,29	10,74	6,44	44,60	12,24	7,58	52,84

* X1 – lactose (g/L), X2 – extrato de levedura (g/L), X3 – sulfato de amônio (g/L)

A Tabela 8 mostra que as melhores respostas para produção de goma foram obtidas após 72 h de fermentação, observando-se que para os seis primeiros ensaios assim como para os ensaios 11 e 13 a produção de goma foi muito similar, atingindo concentração máxima ao redor de 18 ± 1 (g/L) e mínima de 11,34 (g/L), para o ensaio 10. Quanto a produção de biomassa, as concentrações variaram entre 2,42 (g/L) - ensaio 5, e 8,92 (g/L) - ensaio 12. O consumo de lactose variou de 40,15 (g/L), no ensaio 9, a 78,28 (g/L) no ensaio 10.

Pela Tabela 8 pode-se observar também que a maior concentração de lactose no meio (ensaio 10), a produção de goma foi a menor entre todos os ensaios, embora o consumo de lactose tenha atingido o máximo em 72 h de fermentação, ademais pode-se observar que não existe muita diferença entre o valor atingido pelo ensaio 10 às 48 h de fermentação (11,40 g/L) e o obtido após 72 h (11,34 g/L) e pela Figura 6, observa-se que a partir de 48 h a produção de goma para este ensaio atingi a fase estacionaria. O ensaio 2 apresentou a melhor produção de goma entre todos os ensaios (18,48 g/L) em 72 h, com importante consumo de lactose (73,17 g/L). Pode-se observar que o excesso de nitrogênio no meio, favorece o crescimento celular mas não assim a produção de goma. Em termos de produtividade observa-se que o ensaio 10 em 24 h, apresenta produtividade de $0,34 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ maior que o valor obtido em 72 h no ensaio 2 ($0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), no entanto e considerado um aspecto de importância, a qualidade da goma obtida no ensaio 10 em 24 h, foi muito baixa, apresentou pouca estabilidade, consistência fraca e baixa elasticidade, caso oposto aconteceu com a goma obtida no ensaio 2 em 72 h, onde a goma apresentou maior textura, foi mais consistente e muito mais elástica, além de apresentar elevado consumo de lactose. Provavelmente este é o motivo pelo qual a maioria dos autores consideram para produção de goma xantana, tempos maiores a 24 h (SOUW e DEMAÏN, 1979; ANTUNES *et al.*, 2000; GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000; KRISHNA LEELA e SHARMA, 2000; NITSCHKE, RODRIGUES e SCHINATTO, 2001; PAPAGIANNI *et al.*, 2001; BARRETO *et al.*, 2008; ROTTAVA *et al.*, 2009; PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011; SAVVIDES, KATSIFAS e HATZINIKOLAOU, 2012).

Em uma análise geral dos dados da Tabela 8 em quanto a produção de goma após 72 h, observa-se que para os ensaios 1, 2, 3, 4 e 13 onde a concentração da fonte de nitrogênio foram as mais baixas, obteve-se maiores valores de produção de goma, os ensaios 5, 6 e 11 mesmo não tendo concentrações mínimas de sulfato de amônio apresentaram valores elevados de produção de goma provavelmente devido aos baixos valores de extrato de levedura. O comportamento é mostrado nas Figuras 6,7,8 e 9.

Na Figura 6 pode-se observar o comportamento na produção de goma para cada ensaio ao longo do tempo de fermentação (72 h), onde para os seis primeiros ensaios assim como para os ensaios 11 e 13 foram reportadas produções de goma que atingiram concentração máxima ao redor de 18 (g/L) e mínima produção para o ensaio com maior concentração de lactose (ensaio 10), onde provavelmente devido a saturação do meio o micro-organismo não encontrara condições ótimas de crescimento atingindo em 48 h de fermentação a fase estacionária, com produção de goma de 11,40 g/L que baixa mais ainda após 72 h, chegando em valor de 11,34 g/L.

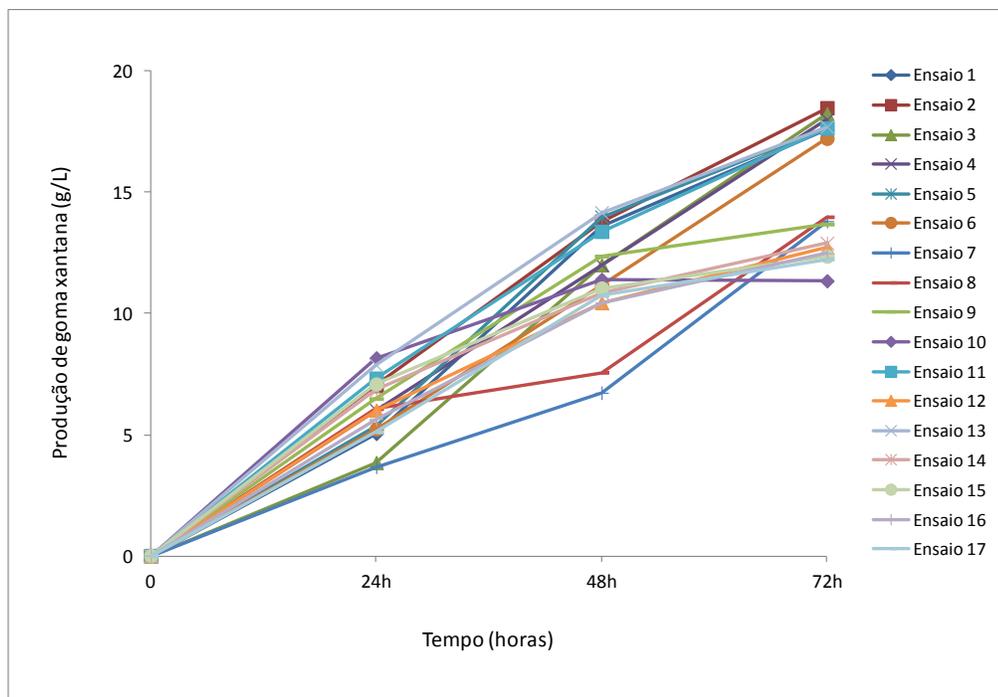


Figura 6 - Produção de goma xantana por *X. campestris* em meio soro de queijo desproteinado, suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).

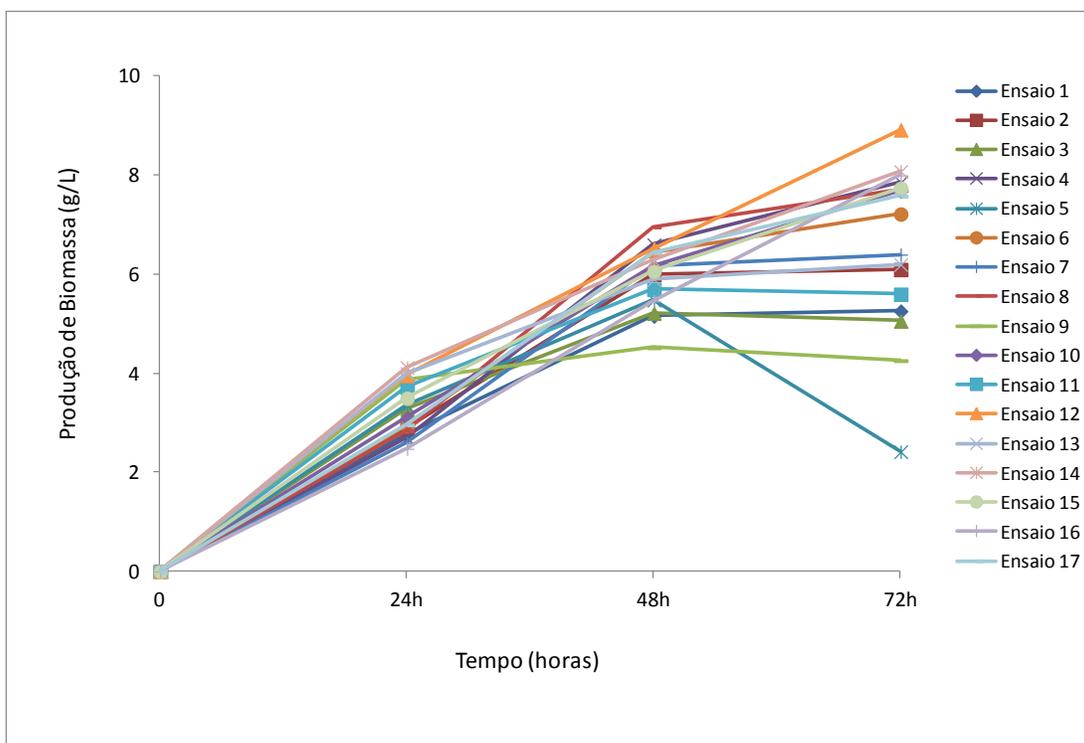


Figura 7 - Produção de Biomassa de *X. campestris* usando como meio soro de queijo desproteinado, suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).

A Figura 7 mostra a produção de biomassa para os diferentes ensaios, cuja concentração variou de 2,42 (g/L) no ensaio 5 até 8,92 (g/L) no ensaio 12, após 72 h de fermentação. A produção de biomassa foi cerca de 3,7 vezes maior no ensaio 12, porém a produção de goma alcançou 5 g/L a mais no ensaio 5, o que pode ser atribuído ao fato deste ser mais pobre em extrato de levedura.

A Figura 8 mostra o comportamento da concentração de lactose consumida (g/L) para cada um dos ensaios, ao longo do tempo de fermentação.

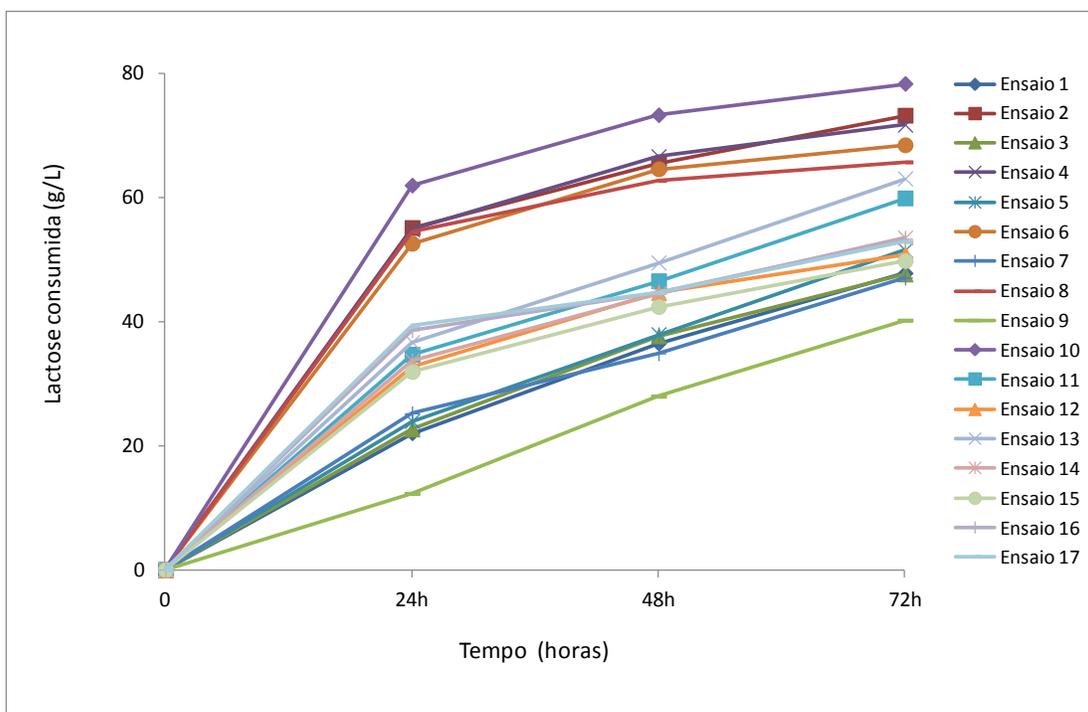


Figura 8 - Lactose consumida no processo de produção de goma xantana por *X. campestris* usando como meio soro de queijo desproteinado desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

O rendimento da produção de goma é mostrado na Figura 9, onde se pode observar que para 24 h de fermentação os valores situam-se na faixa de 10% - 23% para todos os ensaios exceto para o ensaio 9 no qual, o valor obtido foi de 53%. Observe-se que no ensaio 9, o conteúdo inicial de lactose assim como de sulfato de amônio eram baixos, o que provavelmente favoreceu a produção num início ao não se ter um meio saturado que permita a inibição por excesso de nutrientes, atingindo em termos de rendimento o máximo de 53% nas primeiras 24 h de fermentação, diminuindo com o tempo. Para o tempo de 48 h os rendimentos obtidos para cada um dos ensaios encontraram-se na faixa de 12% - 44%, já para o tempo final de fermentação de 72 h, obteve-se rendimentos entre 15% e 38% para todos os ensaios. Comportamento parecido observa-se no estudo realizado por Nitschke *et.al* (2001), que utilizaram soro de leite como meio com concentração de 1,5% lactose, 0,2% NH_4Cl e 0,1% extrato de levedura, e em condições de fermentação de 28°C, 200 rpm, o rendimento na produção

de goma xantana para as primeiras 20 h foi de 45%, após 30 h de processo o rendimento foi de 75% e no final depois de 70 h o rendimento total atingiu 55%.

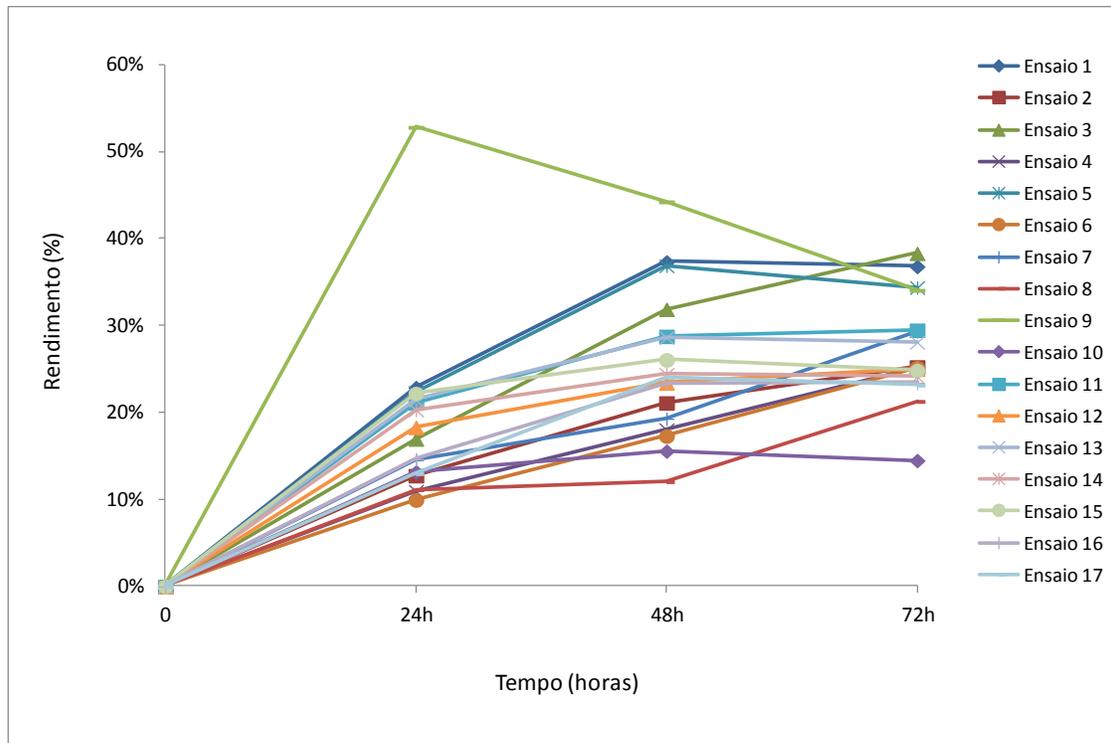


Figura 9 – Rendimento na produção de goma xantana por *X. campestris* usando como meio soro desproteínado de queijo suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Em relação aos valores de pH, mostrados na Tabela 9, pode-se observar que para os ensaios com baixas concentrações dos componentes dos meios de cultura, os valores do pH apresentaram leve diminuição em função ao tempo de fermentação, sendo o valor mais baixo pH 6,2 no ensaio 9 em 72 h. No caso dos ensaios com maiores concentrações de componentes, observou-se que o valor de pH ficou praticamente constante e perto da neutralidade até 72 h de fermentação.

Tabela 9 - Valores de pH para os diferentes ensaios do DCCR (2³) no processo de produção de goma xantana por *X. campestris* usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com de extrato de levedura e sulfato e amônio como fonte de nitrogênio.

Ensaio	Valores de pH		
	24 h	48 h	72 h
1	7,16	6,94	6,49
2	7,17	7,16	7,35
3	7,18	7,04	6,53
4	7,23	7,19	7,28
5	7,18	6,94	6,24
6	7,12	7,07	7,11
7	7,30	7,03	6,93
8	7,16	7,19	7,27
9	7,23	6,84	6,20
10	7,25	7,22	7,36
11	7,20	7,09	6,73
12	7,25	7,20	7,29
13	7,24	7,12	6,83
14	7,22	7,14	7,22
15	7,18	7,23	7,28
16	7,23	7,07	7,28
17	7,25	7,03	7,02

Observa-se que os meios nos quais o pH manteve-se próximo à neutralidade proporcionaram melhores condições de produção de goma até o final da fermentação, embora o crescimento celular houvesse atingido a fase de crescimento estacionário.

Muitos autores concordam que o pH neutro é o melhor para o crescimento do *X. campestris*. Durante a produção da goma xantana, o pH decresce de neutro para valores até próximos a 5,0 por causa da formação de grupos ácidos presentes na goma xantana. Quando o pH é controlado, a produção da goma cessa na fase de crescimento estacionária e este efeito independe do álcali usado para controlar o pH. Quando o pH não é controlado, a produção da goma continua durante a fase de crescimento estacionário (GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000).

6.3.1.1. Produção de goma xantana (g/L)

Através dos resultados obtidos foram calculados os coeficientes de regressão para a resposta produção de goma (g/L), apresentados na Tabela 10, para tempo de 72 h de fermentação. Para o delineamento composto central rotacional foram analisados os fatores lineares e quadráticos para cada variável, assim como as interações entre cada uma delas, observando-se que as interações das variáveis X_1X_2 e X_1X_3 não foram estatisticamente significativas ao nível de significância de 10% ($p < 0,10$).

Tabela 10 - Coeficientes de regressão para a resposta concentração de goma xantana (g/L) usando como meio soro de queijo desproteinado, suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Fatores *	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	T	p-valor
Média	12,20	0,07	176,49	0,0000
X1 (L)	-0,26	0,03	-8,06	0,0150
X1 (Q)	0,59	0,04	16,55	0,0036
X2 (L)	-1,12	0,03	-34,35	0,0008
X2 (Q)	1,54	0,04	42,96	0,0005
X3 (L)	-1,29	0,03	-39,85	0,0006
X3 (Q)	1,58	0,04	44,15	0,0005
X1 X2	-0,06	0,04	-1,41	0,2929
X1 X3	-0,12	0,04	-2,83	0,1056
X2 X3	-0,91	0,04	-21,57	0,0021

* X1 – lactose, X2 – extrato de levedura, X3 – sulfato de amônio

A Equação (1) a seguir descreve a produção de goma xantana prevista pelo modelo matemático em função das variáveis codificadas, contendo apenas os termos estatisticamente significativos, esta equação apresenta modelo de segunda ordem.

$$\text{Produção de Goma (g/L)} = 12,20 - 0,26X_1 + 0,59X_1^2 - 1,12X_2 + 1,54X_2^2 - 1,29X_3 + 1,58X_3^2 - 0,91X_2X_3 \quad (1)$$

Para determinar a validade do modelo calculado, foi calculado o coeficiente de determinação R^2 considerando o modelo reparametrizado, (Tabela 11).

Tabela 11 - ANOVA para resposta produção de goma xantana (g/L) para 72 h de fermentação, usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	89,87	7	12,84	5,14	2,51	2,0
Resíduos	22,4829	9	2,50			
Total	112,3560	16				

% variação explicada (R^2) = 80%

Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que o modelo matemático pode ser utilizado para predição da produção de goma xantana, dentro da faixa estudada em nível de confiança de 90%, uma vez que $F_{\text{tabelado}} < F_{\text{calculado}}$. Além disso o coeficiente R^2 foi de 80% para o mesmo nível de confiança.

A Figura 10 mostra os valores observados experimentalmente e os previstos pelo modelo para a resposta produção de goma. Observa-se boa concordância entre os mesmos, o que era esperado com base nos resultados da análise de variância.

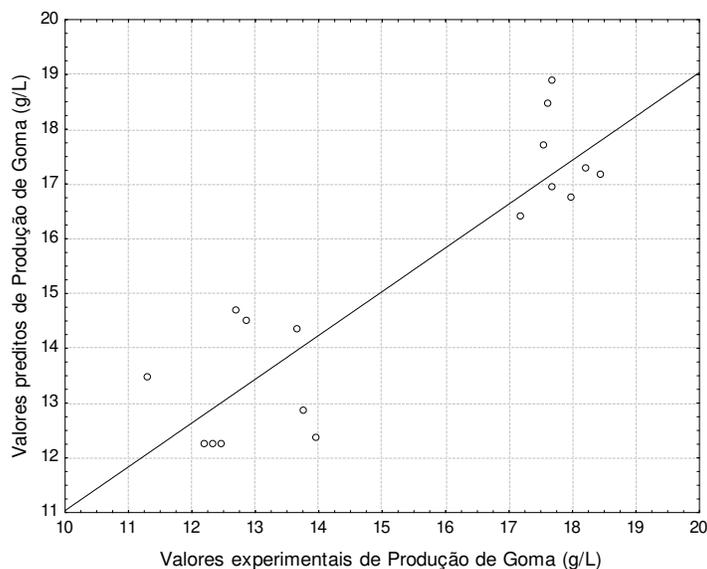


Figura 10 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a produção de goma xantana (g/L).

Como o teste F apresentou significância para a resposta produção de goma, foi possível descrever os resultados através das superfícies de resposta da Figura 11.

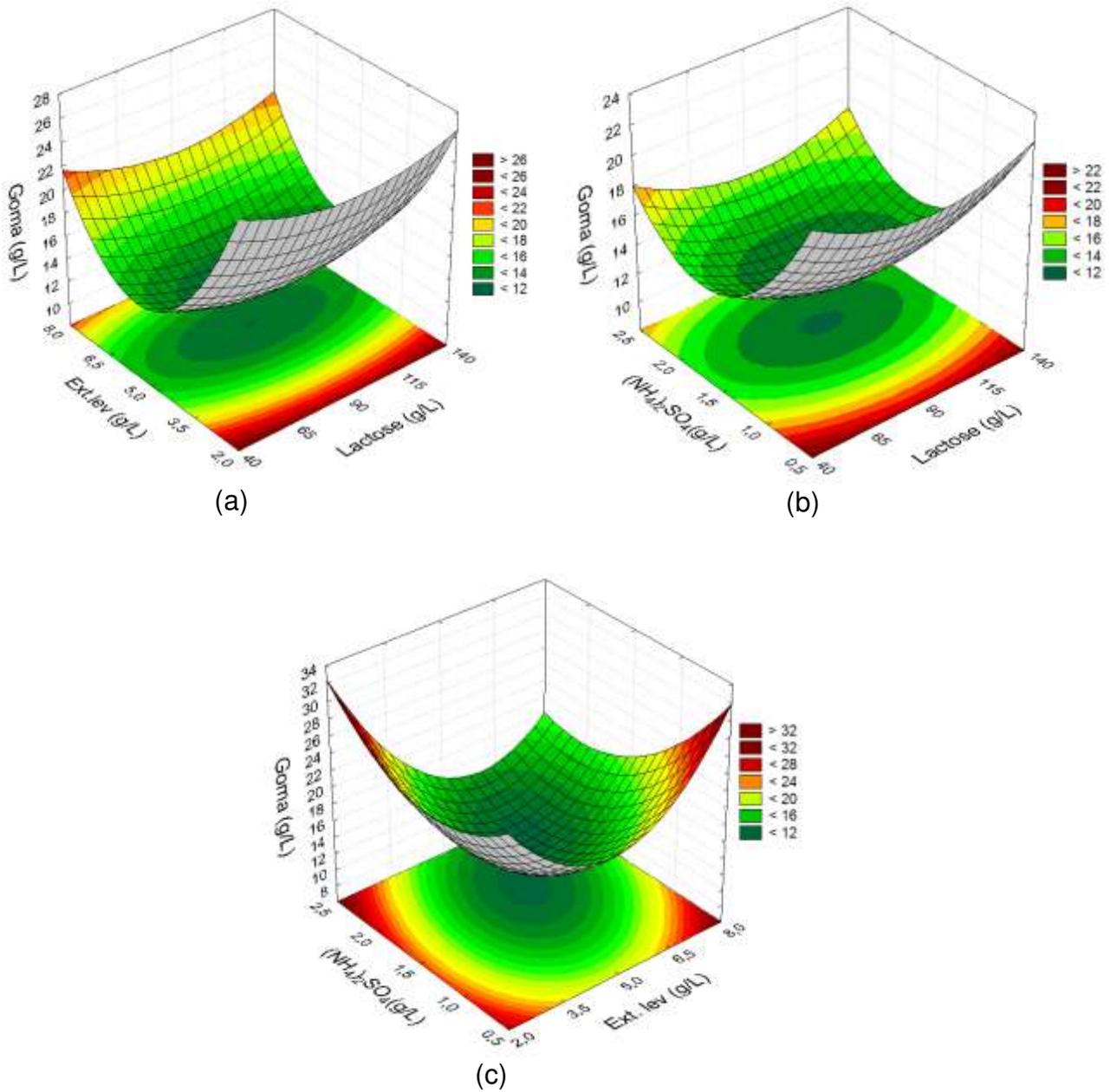


Figura 11 - Superfícies de resposta para produção de goma xantana (g/L) em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a), da concentração de lactose e de sulfato de amônio (b) e da concentração de extrato de levedura e de sulfato de amônio (c).

Analisando a resposta produção de goma (g/L) em função das concentrações de extrato de levedura e sulfato de amônio (Figuras 11a e 11b), observamos que para a faixa analisada de ambas variáveis, a máxima produção de goma ocorreu quando utilizou-se as concentrações mais baixas das fonte de nitrogênio (nível -1,68), para toda a faixa de concentração de lactose (44 - 133 g/L). A Figura 11c mostra os efeitos do extrato de levedura e sulfato de amônio na produção de goma xantana, observando-se que a produção da goma atinge o máximo quando utilizada a concentração mais baixa (nível -1,68) e/ou a concentração mais alta (nível 1,68), tanto para o extrato de levedura quanto para o sulfato de amônio.

6.3.1.2. Produção de biomassa (g/L)

Para a resposta produção de biomassa para o delineamento composto central rotacional, analisando os fatores lineares e quadráticos para cada uma das variáveis, assim como as interações entre elas, observa-se que somente a interação das variáveis X_1X_2 não foi estatisticamente significativa ao nível de significância de 10% ($p < 0,10$), como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Coeficientes de regressão para a resposta produção de biomassa (g/L) usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio.

Fatores*	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	T	p-valor
Média	7,82	0,12	64,02	0,0002
X1 (L)	1,13	0,06	19,78	0,0025
X1 (Q)	-0,80	0,06	-12,66	0,0062
X2 (L)	0,85	0,06	14,81	0,0045
X2 (Q)	-0,34	0,06	-5,43	0,0322
X3 (L)	0,19	0,06	3,35	0,0789
X3 (Q)	-0,39	0,06	-6,11	0,0258
X1 X2	-0,19	0,07	-2,57	0,1240
X1 X3	0,31	0,07	4,10	0,0546
X2 X3	0,36	0,07	4,84	0,0402

* X1 – lactose, X2 – extrato de levedura, X3 – sulfato de amônio

A Equação (2) a seguir descreve a produção de biomassa em função das variáveis codificadas, contendo apenas os termos estatisticamente significativos:

$$\text{Produção de Biomassa (g/L)} = 7,82 + 1,13X_1 - 0,80X_1^2 + 0,85X_2 - 0,34X_2^2 + 0,19X_3 - 0,39X_3^2 + 0,31X_1X_3 + 0,36X_2X_3 \quad (2)$$

Da mesma forma que para produção de goma a equação, para produção de biomassa é também de segunda ordem.

A análise de variância para a resposta produção de biomassa, mostrada na Tabela 13, apresentou significância estatística para o modelo, a nível de confiança de 90%, visto ter sido o valor de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, assim como também coeficiente de determinação R^2 igual a 83%, comprovando a validade do modelo utilizado.

Tabela 13 - ANOVA para resposta produção de biomassa (g/L) para 72 h de fermentação usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Fcalc	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	37,29	8	4,66	5,03	2,59	1,9
Resíduos	7,4175	8	0,93			
Total	44,7056	16				

% variação explicada (R^2) = 83%

A Figura 12 mostra os valores observados experimentalmente e os previstos pelo modelo, associado a resposta produção de biomassa. Pode-se observar que o modelo gerou respostas próximas aos valores experimentais correspondentes.

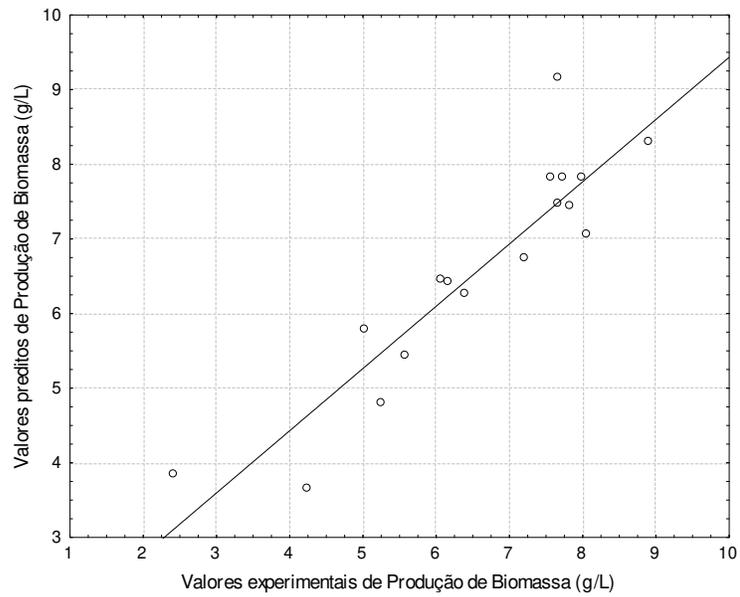
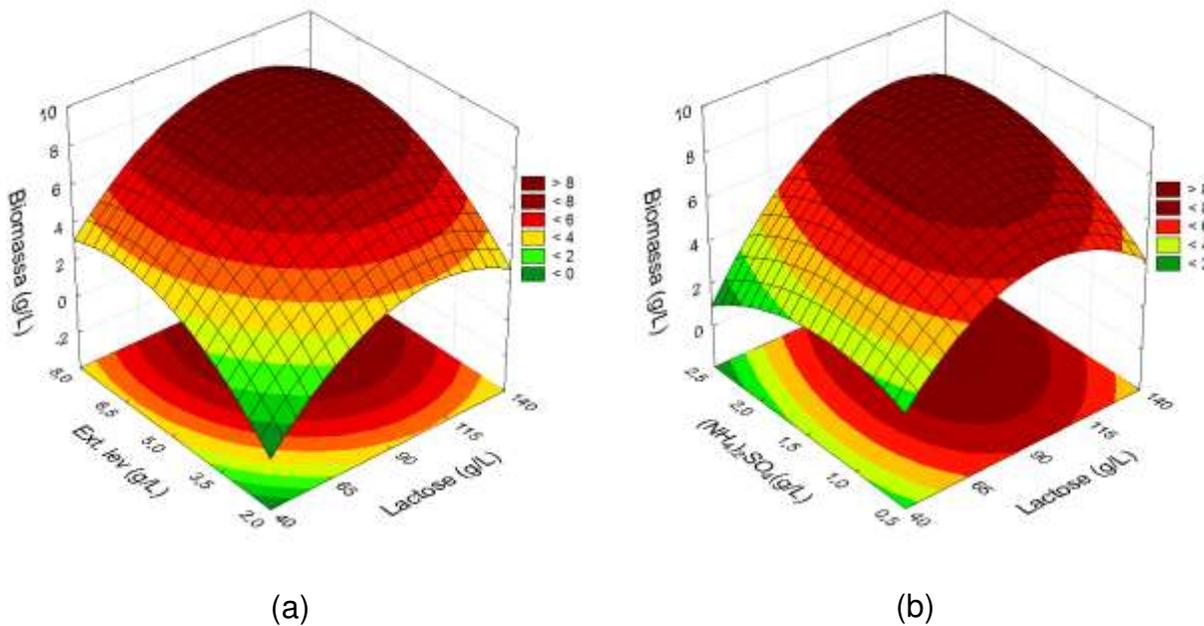
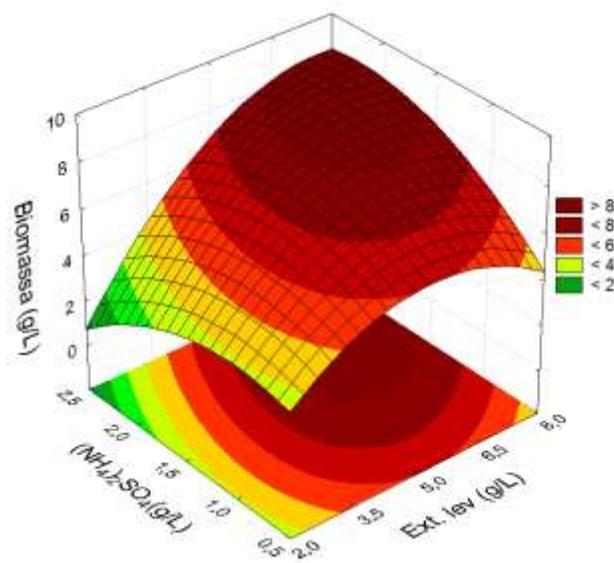


Figura 12 - Concentrações de biomassa preditos pelo modelo matemático versus concentrações experimentais

O comportamento da produção de biomassa em relação as variáveis do modelo, podem ser observadas pelas superfícies de resposta das Figuras 13a, 13b e 13c.





(c)

Figura 13 - Superfícies de resposta para produção de biomassa (g/L) em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a), da concentração de lactose e de sulfato de amônio (b) e da concentração de extrato de levedura e de sulfato de amônio (c).

Analisando as superfícies de resposta (Figura 13), observamos que as condições de maior massa celular foram obtidas nas concentrações referentes ao ponto central, para as três variáveis estudadas. As regiões das curvas com valores um pouco menores as do ponto central, que levaram às mesmas respostas de densidade óptica ocorreram quando utilizadas altas concentrações de extrato de levedura (níveis 0 até 1,68) correspondente aos valores de 5, 6,19 e 7 (g/L) e concentrações de lactose (níveis 0 – 1) que corresponde aos valores de 89 e 116 (g/L) (Figura 13a). No caso da Figura 13(b), quando se utilizaram concentrações de sulfato de amônio (níveis -1 – 0) de 1 e 1,5 (g/L) e concentrações de lactose (níveis -1 até 1) de 62, 89 e 116 (g/L). Para o caso da Figura 13(c), quando utilizadas concentrações intermediárias de extrato de levedura, (níveis -1 até 1) correspondente aos valores de 3,81; 5 e 6,19 (g/L) e baixas concentrações de sulfato de amônio, (níveis -1,68 até 0) que corresponde a valores analisados de 0,625; 1 e 1,5 (g/L).

6.3.1.3. Consumo de Lactose (g/L)

Para a resposta lactose consumida foram calculados os coeficientes de regressão para o delineamento composto central rotacional analisando os fatores lineares e quadráticos, assim como as interações entre elas como mostrado na Tabela 14. O termo quadrático para a variável X_2 assim como para as interações X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 , não apresentaram significância estatística no nível de significância de 10% ($p < 0,10$).

Tabela 14 - Coeficientes de regressão para lactose consumida (g/L) usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio em 72 h de fermentação.

Fatores*	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	T	p-valor
Média	51,88	1,11	46,83	0,0005
X1 (L)	10,92	0,52	20,99	0,0023
X1 (Q)	2,82	0,57	4,93	0,0388
X2 (L)	-1,76	0,52	-3,39	0,0773
X2 (Q)	1,45	0,57	2,53	0,1271
X3 (L)	-1,73	0,52	-3,33	0,0795
X3 (Q)	2,47	0,57	4,31	0,0498
X1 X2	0,04	0,68	0,07	0,9539
X1 X3	-1,74	0,68	-2,55	0,1252
X2 X3	-0,69	0,68	-1,01	0,4174

* X1 – lactose, X2 – extrato de levedura, X3 – sulfato de amônio

O modelo matemático obtido é de segunda ordem e esta representado pela Equação (3) abaixo.

$$\text{Lactose consumida (g/L)} = 53,74 + 10,92X_1 + 2,39X_1^2 - 1,76X_2 - 1,73X_3 + 2,04X_3 \quad (3)$$

A Tabela 15 apresenta a análise de variância para a resposta lactose consumida, cujos resultados mostram que o modelo é altamente significativo a nível de confiança de 90%.

Tabela 15 - ANOVA para resposta Lactose consumida (g/L) para 72h de fermentação usando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com de extrato de levedura e sulfato de amônio.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	1812,83	5	362,57	46,40	2,45	18,9
Resíduos	85,9537	11	7,81			
Total	1898,7797	16				

% variação explicada (R^2) = 95%

O valor de $F_{\text{calculado}}$ foi bastante maior ao valor de F_{tabelado} , e o coeficiente de determinação R^2 igual a 95%, mostrando a validade do modelo utilizado.

A relação entre os valores experimentais e previstos para lactose consumida são apresentados na Figura 14, observando-se bom ajuste do modelo ao ter respostas próximas.

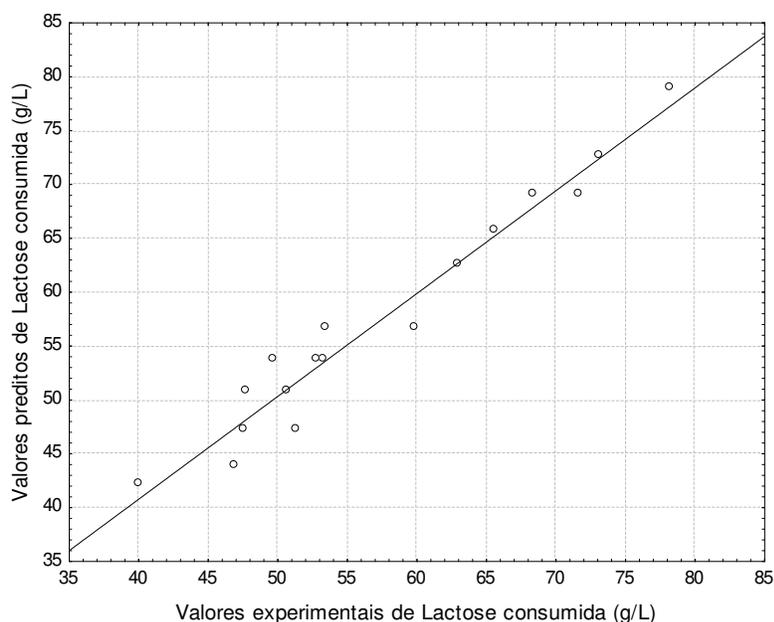


Figura 14 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta lactose consumida.

Para observar o comportamento da lactose consumida no processo de produção de goma, em relação às variáveis do modelo, as superfícies de resposta estão ilustradas na Figura 15 a e b.

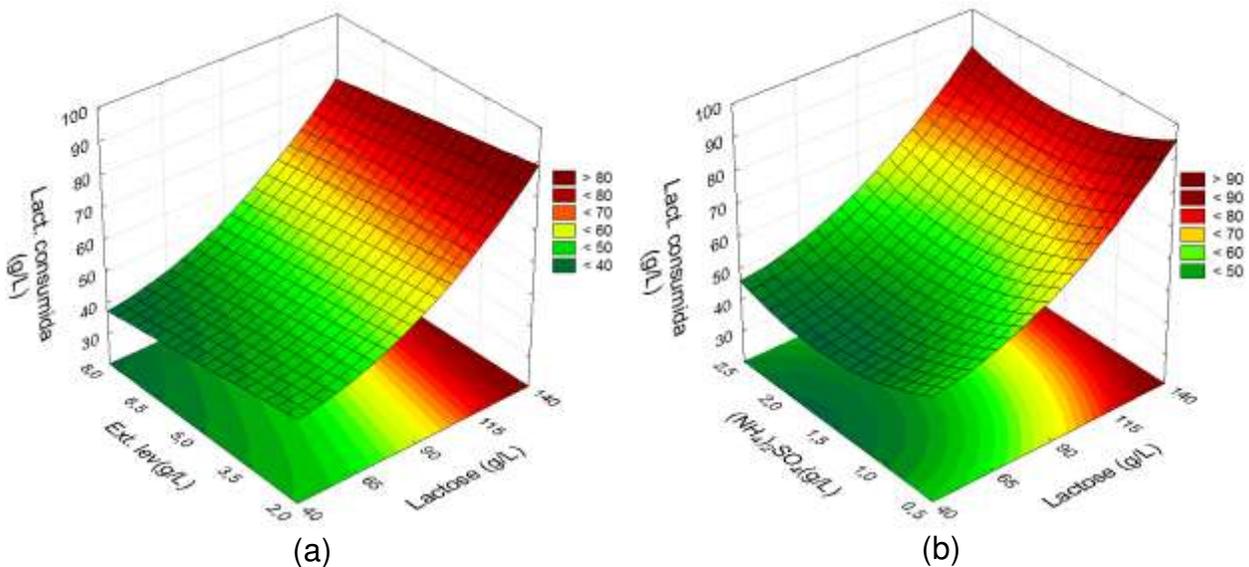


Figura 15 - Superfícies de resposta para lactose consumida (g/L) em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a) e da concentração de lactose e de sulfato de amônio (b).

Através das superfícies de respostas Figura 15a e 15b, observa-se que para concentrações maiores de lactose (nível 1,68), o consumo de lactose for alto independente da concentração de extrato de levedura ou sulfato de amônio, para os quais não mostra significância para toda a faixa de concentração utilizada.

Levando em consideração que para os três componentes do meio de cultura estudados pode-se utilizar concentrações mínimas ou máximas para obter altas produções de goma xantana, optou-se por utilizar concentrações mais baixas para reduzir os custos do processo.

6.3.2. Otimização da produção de goma xantana através de Delineamento composto central rotacional para o meio constituído de soro de queijo desproteinado, extrato de levedura e uréia

A Tabela 16 mostra a matriz dos 17 ensaios com os valores em g/L das variáveis estudadas, assim como as respostas (g/L) de produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida para o meio constituído de soro de queijo desproteinado, extrato de levedura e uréia, em tempos de fermentação de 24 h, 48 h e 72 h.

Observa-se na Tabela 16 que as melhores respostas para produção de goma para o meio constituído de soro de queijo desproteinado, extrato de levedura e uréia foram obtidos em 72 h de fermentação, com maior produção de goma (19,26 g/L) no ensaio 5, que combina concentrações baixas de lactose e extrato de levedura e a maior concentração de uréia, e mesmo que não apresentase elevado consumo de lactose, a produtividade obtida neste ensaio ($0,27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi a maior entre todos os ensaios em 72 h. A menor produção de goma em 72 h (9,90 g/L), corresponde ao ensaio 4, que combina altas concentrações de lactose e extrato de levedura e concentração intermediária de uréia. O maior consumo de lactose no meio (75,15 g/L) foi atingido pelo ensaio 10 mas a produção de goma foi muito baixa (10,44 g/L), com produtividade de ($0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Para produção de biomassa, as concentrações variaram entre 3,52 (g/L), (ensaio 9) e 7,90 (g/L) (ensaio 8) em 72 h de fermentação. Quanto ao caso de consumo de lactose, os valores variaram entre 42,36 (g/L), (ensaio 9) e 75,15 (g/L) o (ensaio 10).

Tabela 16 - Produção de goma xantana por *X. campestris* utilizando soro de queijo desproteinado suplementado com uréia: goma xantana, biomassa e lactose consumida (g/L).

Ensaio	X1*	X2*	X3*	Goma 24h	Biomassa 24h	Lact. Cons. 24h	Goma 48h	Biomassa 48h	Lact. Cons. 48h	Goma 72h	Biomassa 72h	Lact. Cons. 72h
1	62,0	3,81	1,4	5,88	3,48	18,78	14,64	5,36	33,26	16,86	4,14	45,93
2	116,0	3,81	1,4	6,18	3,66	48,39	12,12	5,90	57,41	16,56	7,44	63,14
3	62,0	6,19	1,4	4,68	3,14	17,25	9,48	5,94	31,00	15,42	7,08	44,74
4	116,0	6,19	1,4	3,60	3,64	46,13	6,72	6,32	57,70	9,90	7,02	61,04
5	62,0	3,81	2,6	6,24	3,60	23,55	11,46	5,48	33,94	19,26	3,80	46,14
6	116,0	3,81	2,6	9,00	3,36	51,12	9,42	6,02	54,80	12,12	7,32	60,59
7	62,0	6,19	2,6	6,12	3,80	20,48	8,10	5,96	30,77	16,68	6,90	42,92
8	116,0	6,19	2,6	9,00	3,48	47,94	10,44	6,60	55,94	10,68	7,90	62,40
9	44,0	5,0	2,0	5,04	3,46	16,47	12,72	5,88	30,13	16,56	3,52	42,36
10	133,0	5,0	2,0	4,56	2,80	58,78	9,24	6,48	70,10	10,44	5,72	75,15
11	89,0	3,0	2,0	4,20	2,72	37,42	9,96	5,92	49,25	16,32	5,70	62,59
12	89,0	7,0	2,0	3,00	2,40	32,78	6,24	5,94	43,59	10,44	7,12	49,81
13	89,0	5,0	1,0	4,44	2,76	35,71	11,88	6,30	48,53	16,68	5,18	62,06
14	89,0	5,0	3,0	2,04	3,28	40,19	6,48	5,80	50,99	14,04	5,78	59,96
15 (C)	89,0	5,0	2,0	6,42	2,98	32,45	7,32	6,26	40,92	15,24	6,12	58,32
16 (C)	89,0	5,0	2,0	7,17	3,40	31,60	8,04	6,10	39,49	14,73	6,32	57,75
17 (C)	89,0	5,0	2,0	7,92	3,76	32,74	8,76	6,28	41,25	14,22	6,40	59,11

* X1 – lactose (g/L), X2 – extrato de levedura (g/L), X3 – uréia (g/L)

En termos de produtividade observa-se na Tabela 16 que os ensaios 6 e 8 em 24 h, apresentaram os valores mas elevados de produtividade ($0.38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) com consumo de lactose de 51 e 48 g/L respectivamente, mas mesmo sendo uma produtividade maior à atingida pelo ensaio 5 após 72 h, é de considerar a qualidade da goma obtida; em 24 h, a goma é pouco estável, de consistência fraca e de baixa elasticidade, características que melhoran consideravelmente na goma obtida após 72 h de fermentação. Este seja provavelmente o motivo pelo qual a maioria dos autores consideram tempos maiores a 24 h na produção de goma xantana (SOUW e DEMAIN, 1979; ANTUNES *et al.*, 2000; GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000; KRISHNA LEELA e SHARMA, 2000; NITSCHKE, RODRIGUES e SCHINATTO, 2001; PAPAGIANNI *et al.*, 2001; BARRETO *et al.*, 2008; ROTTAVA *et al.*, 2009; PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011; SAVVIDES, KATSIFAS e HATZINIKOLAOU, 2012).

Também pela Tabela 16, observa-se em quanto produção de goma, que após 72 h, os ensaios com menor concentração de lactose, apresentaram maior produção de goma, o ensaio 2 mesmo não tendo baixa concentração de lactose atingiu elevada produção de goma (16,56 g/L) provavelmente devido às baixas concentrações das outras variáveis, este comportamento é apreciado nas Figuras 16, 17, 18 e 19.

As Figuras 16 e 17 mostram a produção de goma e de biomassa respectivamente, para os diferentes ensaios ao longo das 72 h de fermentação.

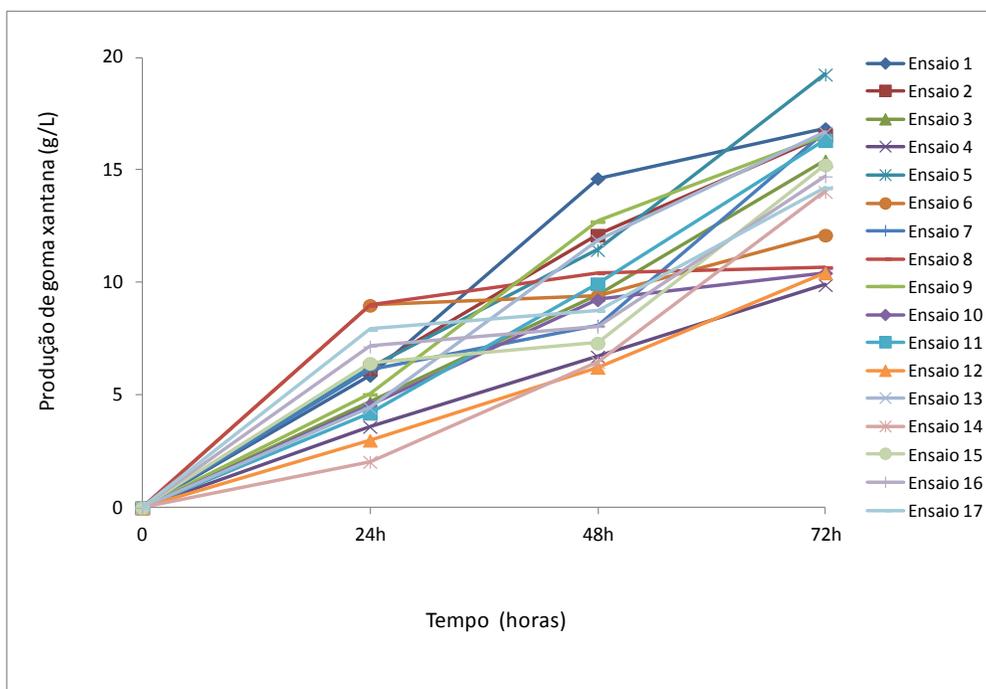


Figura 16 - Produção de goma xantana utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).

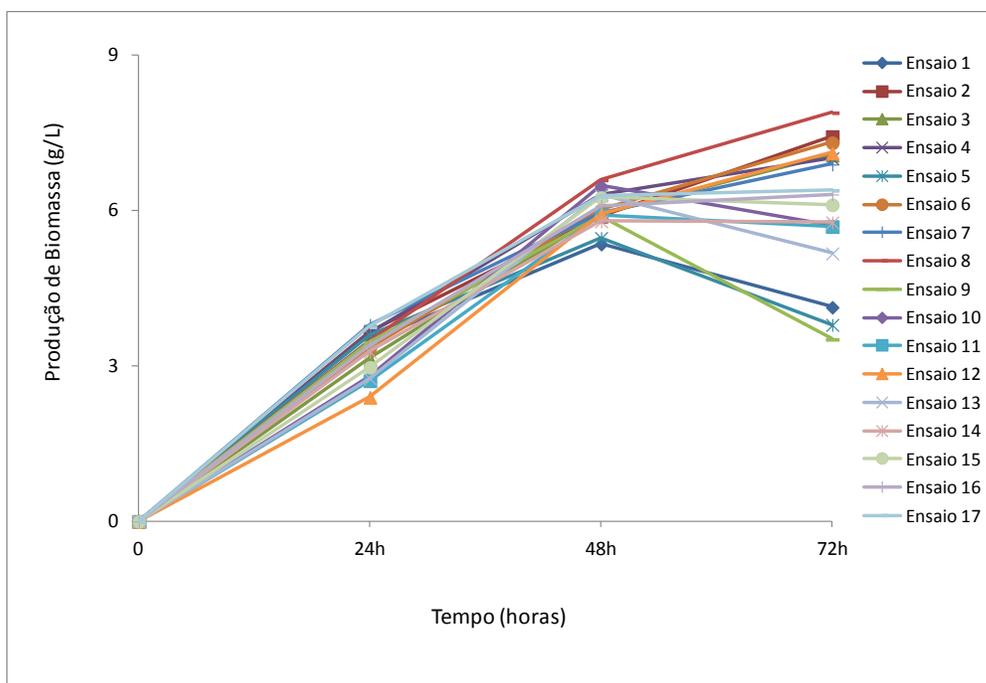


Figura 17 - Produção de biomassa *X. campestris* utilizando como meio, soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).

Comparando as Figuras 16 e 17, observa-se que em quanto a produção de goma cresce a biomassa atinge valores mais baixos, assim no ensaio 5 que atingiu a máxima produção de goma (19,26 g/L) após 72 h, o valor de biomassa foi de 3,80 g/L e no ensaio 4 com produção de goma de 9,90 g/L o valor de biomassa foi quase o dobro que no ensaio 5 com valor de 7,02 g/L.

A Figura 18 mostra o comportamento da concentração de lactose consumida (g/L) para cada um dos ensaios, ao longo do tempo de fermentação.

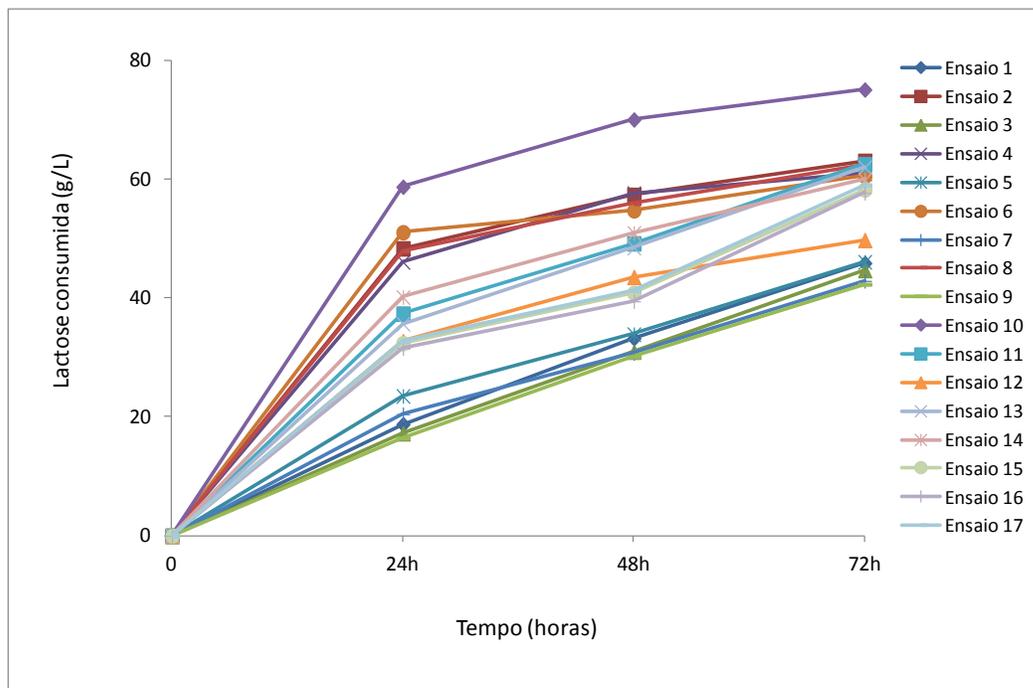


Figura 18 - Lactose consumida no processo de produção de goma xantana utilizando como meio, soro de queijo desproteínado suplementado com extrato de levedura e uréia para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).

A Figura 19 mostra os rendimentos da produção de goma. Em 24 h de fermentação o rendimento dos ensaios cresce na faixa de 5% - 31%. Para o tempo de 48 h os rendimentos obtidos para cada um dos ensaios encontraram-se na faixa de

12% - 44%, entanto que para o tempo final de fermentação de 72 h, obteve-se rendimentos entre 14% e 42% para todos os ensaios.

Observe-se que nos ensaios 1 e 9 as concentrações iniciais de lactose e uréia são baixos pelo qual provavelmente o micro-organismo encontrou até as primeiras 48 h condições ótimas de crescimento atingindo em termos de rendimento, valores de 44% e 42% respectivamente que diminuíram com o tempo, atingindo às 72 h valores de 37% e 39%.

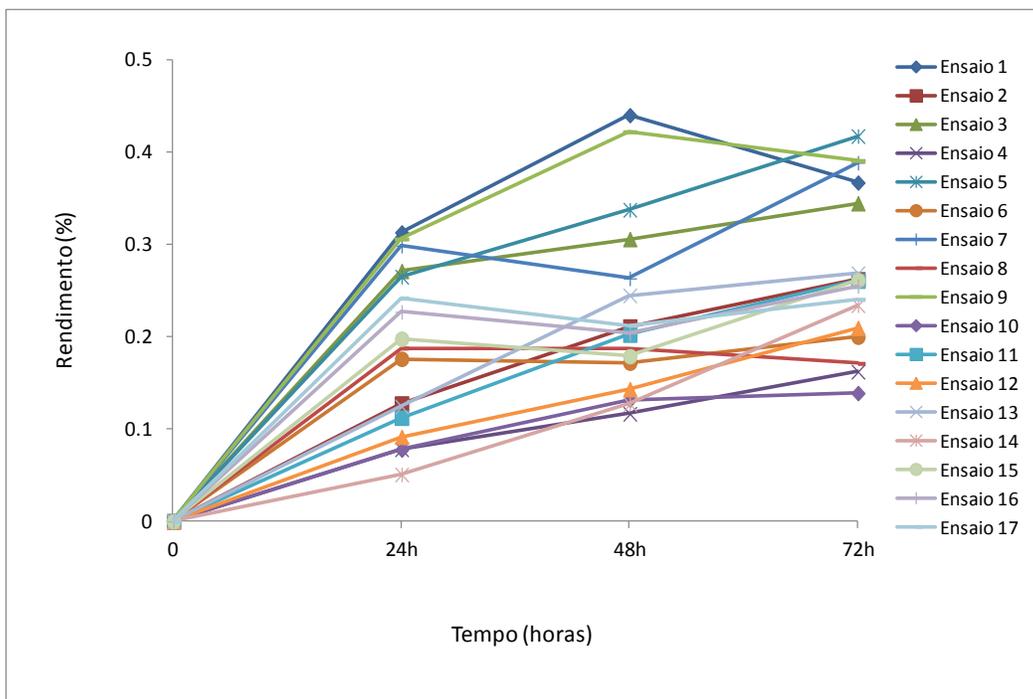


Figura 19 – Rendimento no processo de produção de goma xantana utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado desproteinado com extrato de levedura e uréia para cada um dos ensaios do DCCR (2^3).

A Tabela 17 mostra os valores de pH obtidos nos diferentes ensaios. Observa-se que para os ensaios que combinam baixas concentrações dos componentes do meio, os valores do pH apresentam uma leve diminuição em função ao tempo de fermentação, sendo o valor mais baixo encontrado no ensaio 9 (6,09) após 72 h de fermentação.

No caso dos ensaios com concentrações maiores dos componentes do meio, observa-se que o valor de pH fica praticamente constante e perto da neutralidade até 72 h, como consequência de maior efeito tampão. Os valores de pH ao final de 72 h de fermentação mostram boas condições de produção de goma, uma vez que são valores próximos a neutralidade e também proporcionam boas condições de crescimento da bactéria.

Tabela 17 - Valores de pH observados para os diferentes ensaios em fermentação de soro de queijo desproteinado para produção de goma xantana.

Ensaio	Valores de pH		
	24 h	48 h	72 h
1	7,30	6,99	6,40
2	7,30	7,38	7,31
3	7,39	7,25	6,90
4	7,40	7,40	7,39
5	7,34	7,15	6,54
6	7,25	7,25	7,25
7	7,30	7,25	6,86
8	7,28	7,27	7,35
9	7,31	6,89	6,09
10	7,30	7,29	7,28
11	7,31	7,18	6,96
12	7,43	7,22	7,34
13	7,39	7,05	6,43
14	7,36	7,19	7,31
15 (C)	7,40	7,10	7,25
16 (C)	7,24	7,15	7,10
17 (C)	7,35	7,13	7,21

6.3.2.1. Produção de goma (g/L)

A produção de goma para o delineamento composto central rotacional foi analisado levando em conta as interações entre as variáveis. Observa-se que apenas os termos lineares para as variáveis X_1 e X_2 e a interação X_1X_3 foram significativos ao nível de significância de 10% ($p < 0,10$), como mostrado na Tabela 18.

Tabela 18 - Coeficientes de regressão para a resposta concentração de goma xantana (g/L) usando como meio soro de queijo desproteínado suplementado com extrato de levedura e uréia como fonte de nitrogênio.

Fatores*	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	T	p-valor
Média	14,69	0,29	49,98	0,0004
X1 (L)	-2,14	0,14	-15,52	0,0041
X1 (Q)	-0,29	0,15	-1,92	0,1947
X2 (L)	-1,61	0,14	-11,68	0,0073
X2 (Q)	-0,33	0,15	-2,20	0,1588
X3 (L)	-0,33	0,14	-2,36	0,1426
X3 (Q)	0,37	0,15	2,41	0,1377
X1 X2	-0,51	0,18	-2,83	0,1056
X1 X3	-0,91	0,18	-5,07	0,0367
X2 X3	0,51	0,18	2,83	0,1056

* X1 – lactose, X2 – extrato de levedura, X3 – uréia

Analisando os coeficientes de regressão (Tabela 18) e ignorando os fatores não significativos ($p < 0,10$) com exceção das interações X_1X_2 e X_2X_3 , obteve-se o modelo de primeira ordem (Equação 4) em função das variáveis estudadas para produção de goma xantana utilizando como meio soro de queijo desproteínado suplementado com extrato de levedura e uréia como fonte de nitrogênio.

$$\text{Produção de Goma (g/L)} = 14,48 - 2,14X_1 - 1,61X_2 - 0,51X_1X_2 - 0,91X_1X_3 + 0,51X_2X_3 \quad (4)$$

Como parte da validação do modelo encontrado foram calculados a Tabela ANOVA (Tabela 19) e o coeficiente de determinação R^2 , considerando os dados do modelo reparametrizado.

Tabela 19 - ANOVA para resposta produção de goma xantana (g/L) para 72h de fermentação usando como meio soro desproteínado de queijo acrescentado de extrato de levedura e uréia como fonte de nitrogênio.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	108,99	5	21,80	14,39	2,45	5,9
Resíduos	16,6589	11	1,51			
Total	125,6453	16				

% variação explicada (R^2) = 87%

Os valores do coeficiente de determinação $R^2 = 87\%$ e do $F_{\text{calculado}}$ bastante maior ao F_{tabelado} mostrados na Tabela 19, corroboram a validade do modelo matemático obtido para a resposta produção de goma xatana dentro da faixa estudada em um nível de confiança de 90%.

A Figura 20 mostra que há boa concordância entre os valores observados experimentalmente e os previstos pelo modelo para produção de goma.

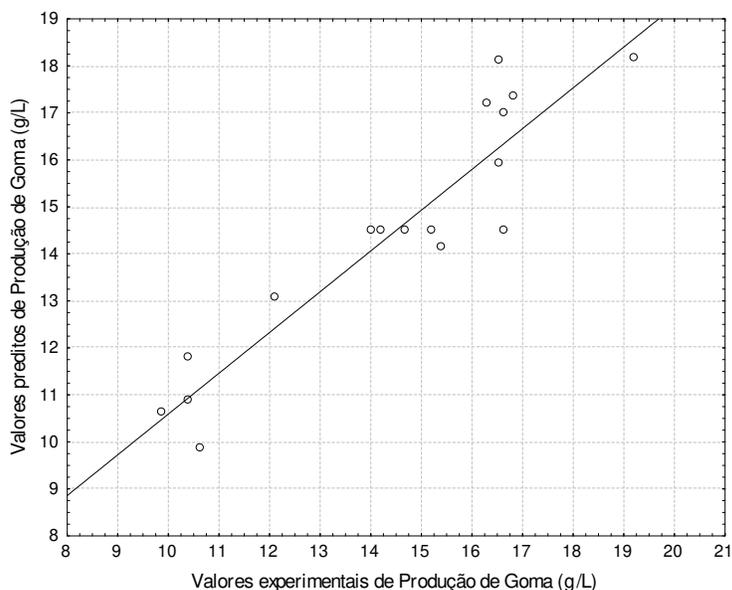


Figura 20 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta produção de goma xantana.

Para observar o comportamento da produção de goma xantana com relação as variáveis do modelo foram analisadas as superfícies de resposta apresentadas na Figura 21.

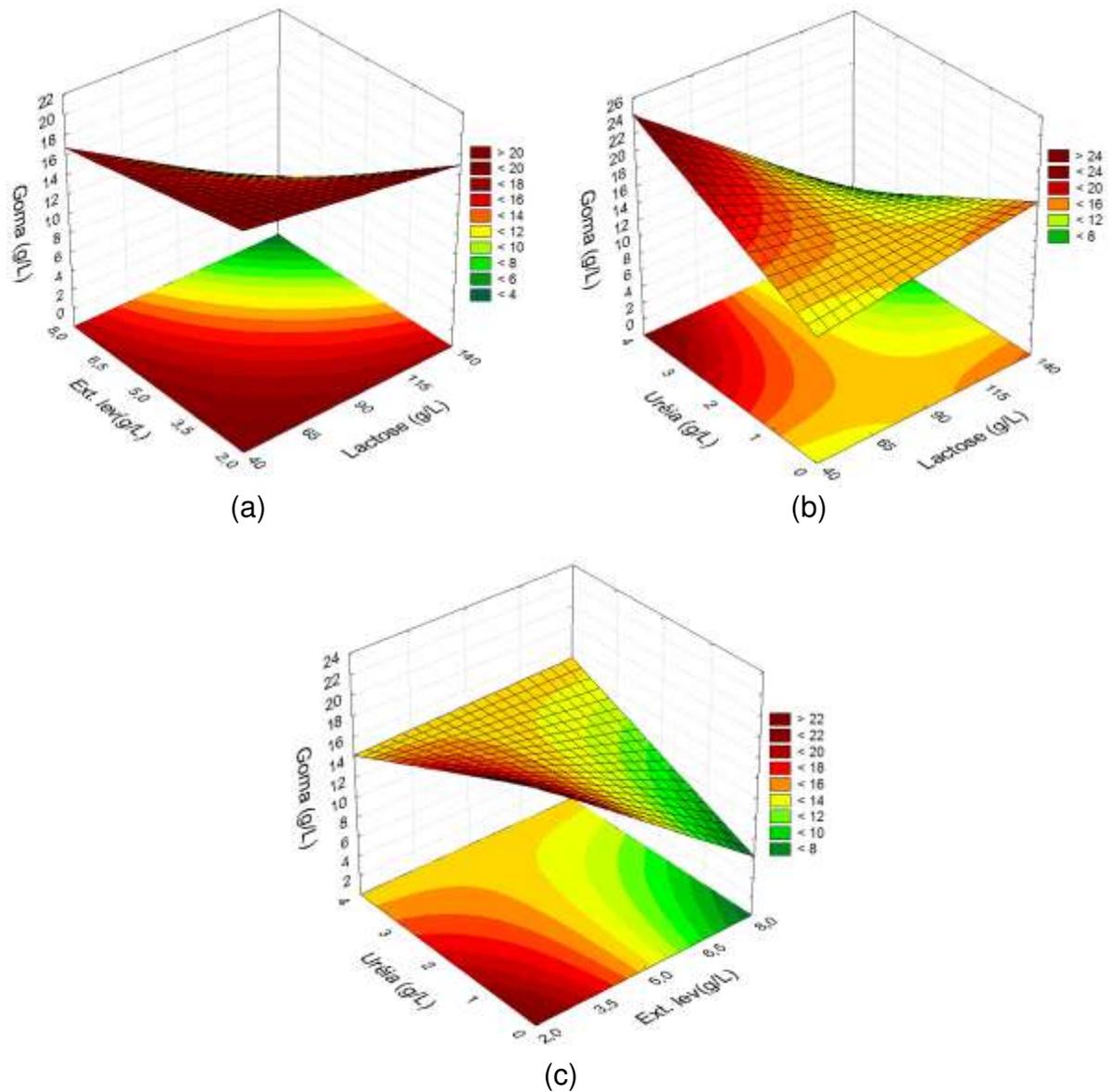


Figura 21 - Superfícies de resposta para produção de goma xantana por *X. campestris* em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a), da cocentração de lactose e de uréia (b) e da concentração de extrato de levedura e de uréia (c).

A superfície de resposta apresentada na Figura 21(a) mostra que quanto mais baixas as concentrações de lactose e extrato de levedura, maior a produção de goma. Através da superfície de resposta da Figura 21(b) verifica-se que quando a concentração de lactose era baixa, a produção de goma aumentou com aumento da concentração de uréia. Na Figura 21(c) observamos os efeitos do extrato de levedura e da uréia na produção de goma xantana, sendo a produção máxima atingida quando foram utilizadas as concentrações mais baixas de ambas variáveis.

6.3.2.2. Produção de biomassa (g/L)

Quanto a produção de biomassa, foram calculados os coeficientes de regressão analisando os fatores lineares e quadráticos para cada uma das variáveis, assim como as interações entre elas como mostrado na Tabela 20.

Analisando os coeficientes de regressão observa-se que tanto os termos lineares como os quadráticos para a variável X_3 não apresentaram significância estatística no nível de significância de 10% ($p < 0,10$). Para o caso da interação X_2X_3 , mesmo não apresentando significância, o valor foi mantido no modelo devido a proximidade deste com o nível de significância utilizado.

Tabela 20 - Coeficientes de regressão para a resposta produção de biomassa usando como meio soro de queijo desproteínado suplementado com de extrato de levedura e uréia.

Fatores*	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	T	p-valor
Média	6,22	0,08	74,80	0,0002
X1 (L)	0,84	0,04	21,50	0,0022
X1 (Q)	-0,37	0,04	-8,53	0,0135
X2 (L)	0,63	0,04	16,11	0,0038
X2 (Q)	0,27	0,04	6,21	0,0250
X3 (L)	0,09	0,04	2,34	0,1438
X3 (Q)	-0,06	0,04	-1,45	0,2845
X1 X2	-0,73	0,05	-14,41	0,0048
X1 X3	0,16	0,05	3,14	0,0883
X2 X3	0,14	0,05	2,84	0,1046

* X1 – lactose, X2 – extrato de levedura, X3 – uréia

Obeve-se a Equação (5) do modelo reparametrizado de segunda ordem a partir das variáveis codificadas, contendo os termos estatisticamente significativos:

$$\text{Produção de Biomassa (g/L)} = 6,14 + 0,84X_1 - 0,35X_1^2 + 0,63X_2 + 0,28X_2^2 - 0,73X_1X_2 + 0,16X_1X_3 + 0,14X_2X_3 \quad (5)$$

A Tabela 21 apresenta os resultados da ANOVA e o coeficiente de determinação.

Tabela 21 - ANOVA para resposta produção de biomassa utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	22,94	7	3,28	6,94	2,51	2,8
Resíduos	4,2519	9	0,47			
Total	27,1878	16				

% variação explicada (R^2) = 84%

A análise de variância para a resposta produção de biomassa no meio em estudo, mostra significância estatística para o modelo a nível de confiança de 90%, sendo $F_{\text{tabelado}} < F_{\text{calculado}}$, assim como também o coeficiente de determinação R^2 obtido de 84%, mostrando a validade do modelo utilizado.

A Figura 22 apresenta os valores observados experimentalmente e os previstos para produção de biomassa. O modelo gerou respostas próximas aos valores experimentais correspondentes.

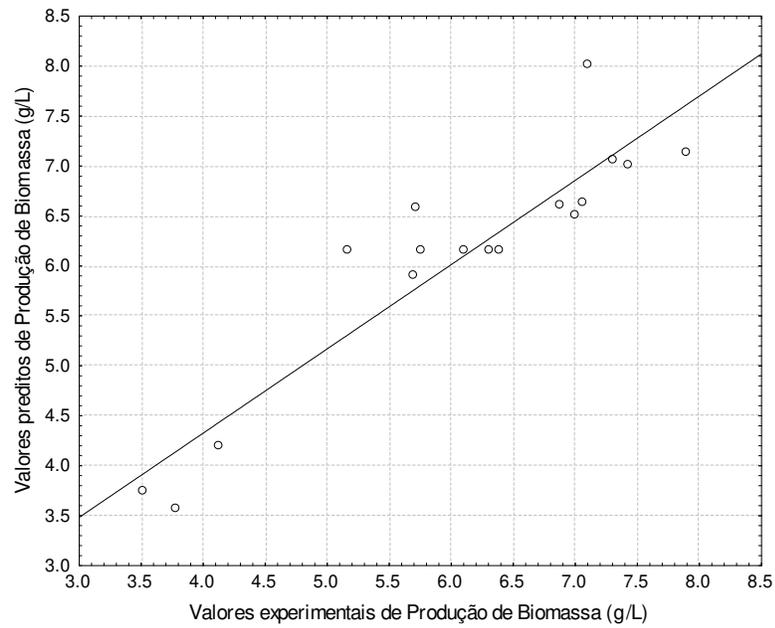
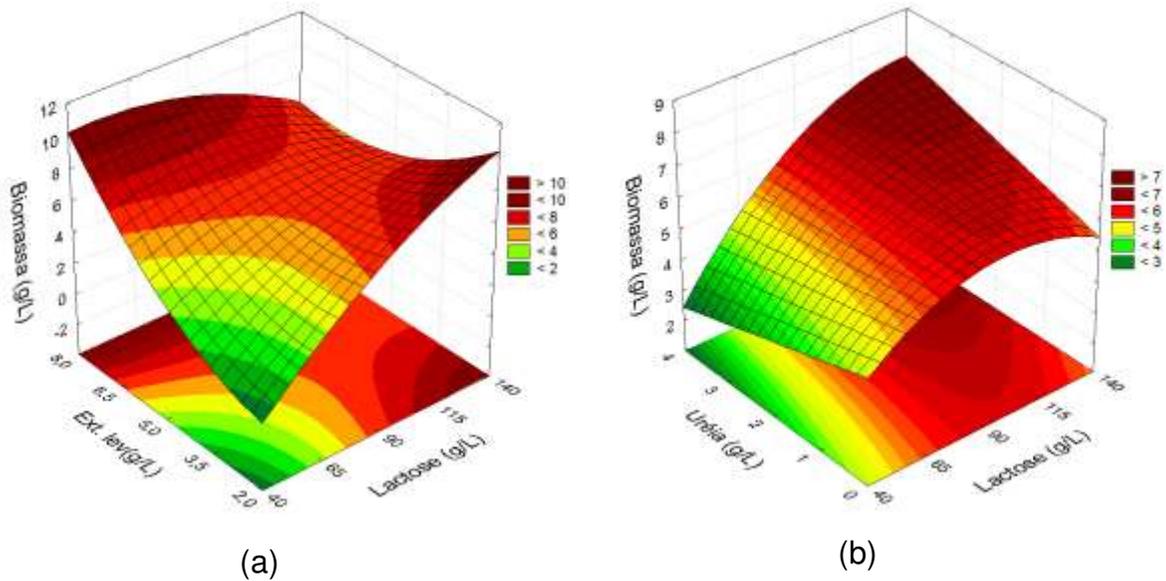
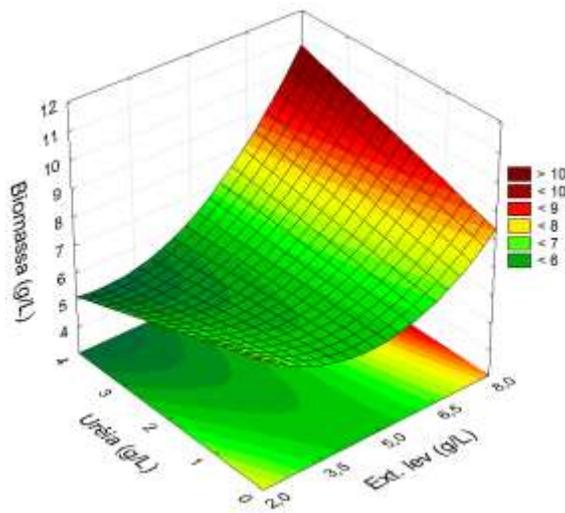


Figura 22 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta produção de biomassa.

A Figura 23 mostra as superfícies de resposta para a produção de Biomassa com relação às variáveis em estudo.





(c)

Figura 23 - Superfícies de resposta para produção de biomassa em função da concentração de lactose e de extrato de levedura (a), da concentração de lactose e de uréia (b) e da concentração de extrato de levedura e de uréia (c).

A Figura 23(a) mostra que a maior produção de massa celular foi obtida nas concentrações mais altas de lactose e de extrato de levedura, a Figura 23(b) mostra que as maiores concentrações de biomassa ocorreram quando se utilizou altas concentrações de lactose e concentrações baixas de uréia e pela Figura 23(c) observa-se que só quando foram utilizadas concentrações altas de extrato de levedura obteve-se maior produção de biomassa, independente da concentração de uréia utilizada.

6.3.2.3. Consumo de Lactose (g/L)

Para o caso da resposta lactose consumida, do meio constituído por soro de queijo desproteinado, extrato de levedura e uréia foram calculados os coeficientes de regressão para o DCCR, analisando fatores lineares e quadráticos das variáveis e suas interações, como mostra a Tabela 22. Vemos que o termo quadrático para a variável X_3 assim como as interações X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 , não apresentaram significância estatística ao nível de significância de 10% ($p < 0,10$). No caso do termo quadrático para a variável

X₃, apesar de não ter apresentado significância, foi mantida no modelo devido a sua proximidade ao nível de significância utilizado.

Tabela 22 - Coeficientes de regressão para a resposta lactose consumida utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia.

Fatores*	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	T	p-valor
Média	58,73	0,39	149,08	0,0000
X1 (L)	8,98	0,19	48,52	0,0004
X1 (Q)	-1,05	0,20	-5,16	0,0356
X2 (L)	-1,92	0,19	-10,36	0,0092
X2 (Q)	-1,95	0,20	-9,59	0,0107
X3 (L)	-0,46	0,19	-2,50	0,1293
X3 (Q)	-0,25	0,20	-1,24	0,3410
X1 X2	0,52	0,24	2,13	0,1668
X1 X3	0,05	0,24	0,22	0,8497
X2 X3	0,24	0,24	0,98	0,4314

* X1 – lactose, X2 – extrato de levedura, X3 – uréia

A Equação (6) representa o modelo reparametrizado de segunda ordem determinado a partir das variáveis codificadas.

$$\text{Lactose consumida (g/L)} = 58,41 + 8,98X_1 - 0,98X_1^2 - 1,92X_2 - 1,88X_2^2 - 0,46X_3 \quad (6)$$

A Tabela 23 apresenta a análise de variância para a resposta lactose consumida, onde os resultados obtidos mostram que o modelo é altamente significativo a nível de confiança de 90%.

Tabela 23 - ANOVA para resposta lactose consumida utilizando como meio soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e uréia.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	F _{tab}	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	1201,12	5	240,22	19,06	2,45	7,8
Resíduos	138,6474	11	12,60			
Total	1339,7717	16				

% variação explicada (R^2) = 88%

Observando que $F_{\text{tabelado}} < F_{\text{calculado}}$, e que o coeficiente de determinação R^2 foi igual a 88%, corrobora-se a validade do modelo utilizado.

Na Figura 24 é mostrada a relação entre os valores observados experimentalmente e os previstos pelo modelo matemático. Nota-se que o modelo gerou respostas próximas aos valores experimentais correspondentes.

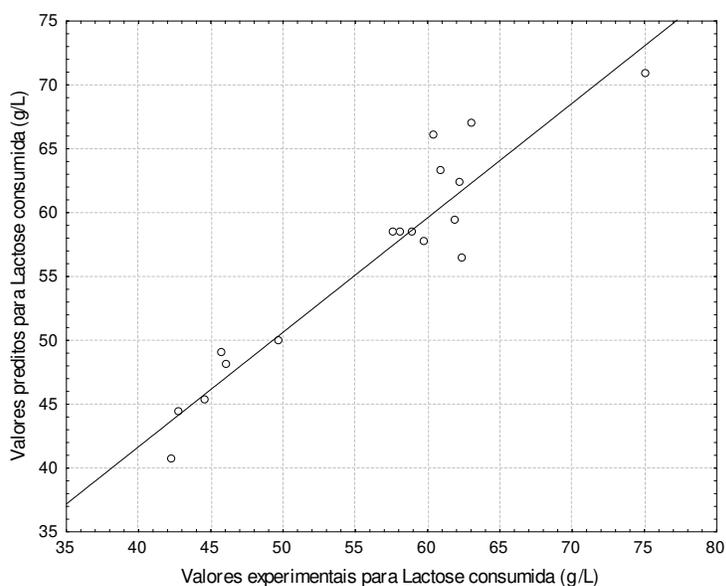


Figura 24 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta lactose consumida.

Para observar o comportamento do consumo de lactose no processo de produção de goma xantana em relação às variáveis do modelo, construiu-se as superfícies de resposta da Figura 25.

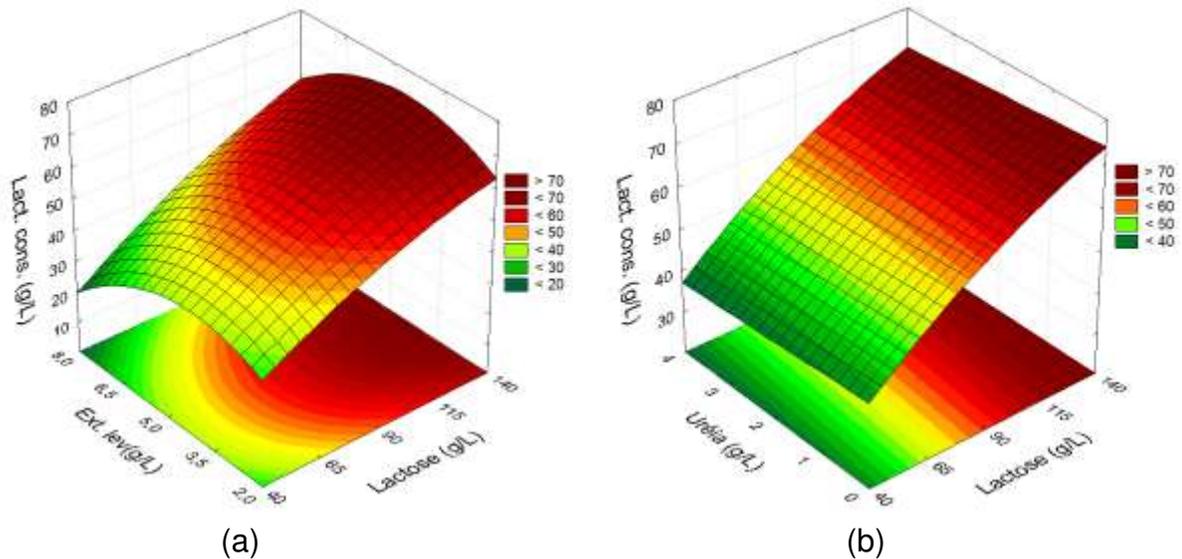


Figura 25 - Superfícies de resposta para lactose consumida (g/L) em função a concentração de lactose e concentração de extrato de levedura (a), e da cocentração de lactose e concentração de uréia (b).

Através das superfícies de resposta da Figura 25(a) e 25(b), observa-se que para concentrações altas de lactose, a lactose consumida na produção de goma foi alta, independente da concentração usada de extrato de levedura ou uréia.

Depois das análises feitas no meio com soro de queijo desproteínado, extrato de levedura e uréia, observou-se que para conseguir boa produção de goma pode-se utilizar valores mínimos de concentração de lactose e de extrato de levedura, e concentrações intermediárias de uréia.

6.3.3. Confirmação experimental das condições otimizadas para cada um dos meios utilizados

A Tabela 24 e as Figuras 26 e 27 apresentam os resultados médios usando as melhores condições dos meios avaliados: lactose, extrato de levedura, sulfato de amônio (44 g/L, 3 g/L e 1,5 g/L) e lactose, extrato de levedura e uréia (44 g/L, 3 g/L e 2 g/L) respectivamente.

Tabela 24 - Concentração de goma xantana, concentração de biomassa e lactose consumida (g/L) em meio constituído por soro de queijo desproteínado contendo sulfato de amônio e uréia.

Tempo (h)	Meio: Soro, Extrato de Levedura e Sulfato de amônio*			Meio: Soro, Extrato de levedura e Uréia*		
	Goma (g/L)	Biomassa (g/L)	Lact. Consumida (g/L)	Goma (g/L)	Biomassa (g/L)	Lact. Consumida (g/L)
24	5,22	2,60	15,66	7,08	3,57	21,84
48	13,44	4,36	29,86	14,70	4,50	32,52
72	20,28	2,64	40,47	18,96	3,60	40,58

* Concentração inicial de lactose-44 g/L.

Observa-se na Tabela 24, em quanto a produção de goma, o meio com sulfato de amônio apresentou valor de 20,28 g/L e rendimento de 50% em 72 h de fermentação, no entanto o meio com uréia atingiu valor de 18,96 g/L com rendimento de 47% para o mesmo tempo de fermentação, ou seja, o meio com sulfato mostrou-se melhor para produção de goma.

Em termos de produtividade, o meio com uréia, apresentou produtividades de 0,30 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,31 g L⁻¹ h⁻¹, em tempos de fermentação de 24 h e 48 h respectivamente, e o meio contendo sulfato de amônio, obteve produtividades de 0,22 g L⁻¹ h⁻¹ em 24 h e 0,28 g L⁻¹ h⁻¹ em 48 h de fermentação. Após 72 h de fermentação, no meio com sulfato de amônio, a produtividade se manteve em 0,28 g L⁻¹ h⁻¹, mas no meio com uréia, a produtividade diminuiu a 0,26 g L⁻¹ h⁻¹. Deve-se observar que mesmo tendo-se obtido maiores valores de produtividade em 24 h e 48 h de fermentação no meio com uréia e em 48 h no meio com sulfato de amônio, um aspecto importante a ser considerado, é a

qualidade da goma xantana produzida, a qual atingiu melhores condições de textura, consistência e elasticidade após 72 h de fermentação.

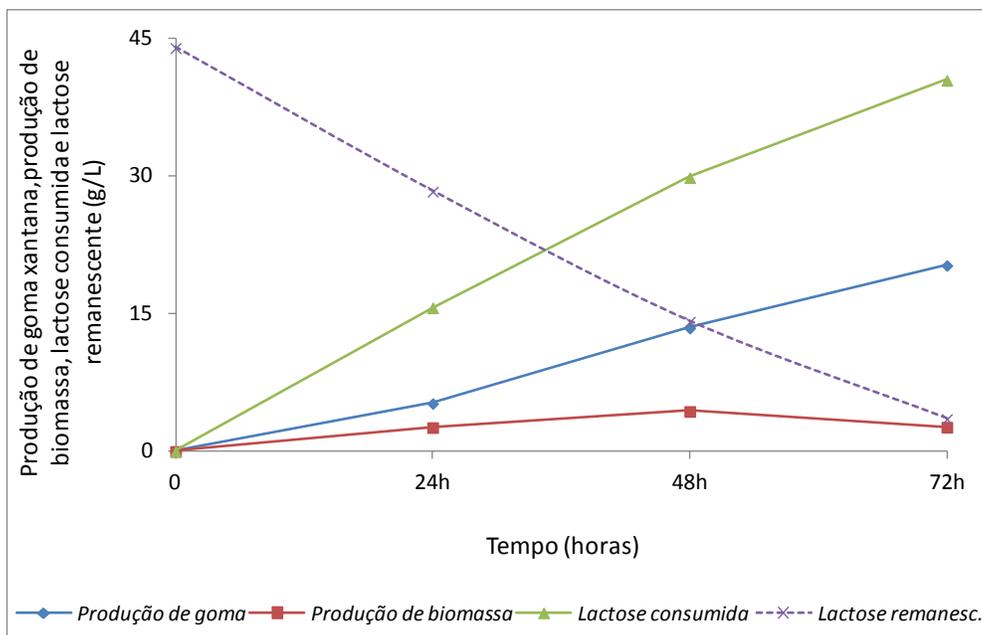


Figura 26 - Concentração de goma xantana, biomassa, lactose consumida e lactose remanescente (g/L) em fermentação de soro de queijo desproteínado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio.

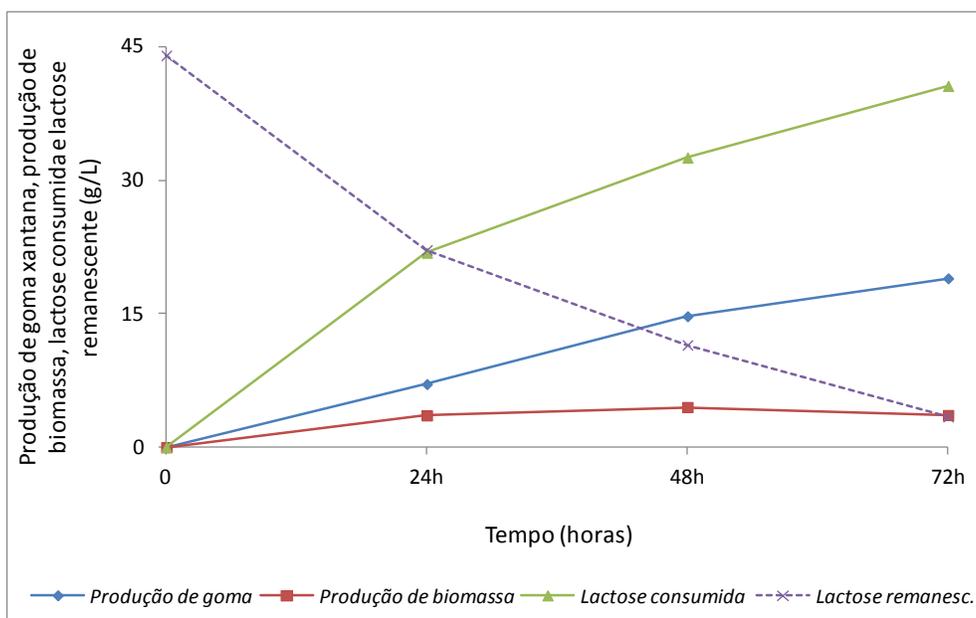


Figura 27 - Produção de goma xantana, biomassa, lactose consumida e lactose remanescente (g/L) em fermentação de soro de queijo desproteínado contendo uréia como fonte de nitrogênio.

Geralmente, baixas concentrações de carbono e nitrogênio são úteis para a produção da goma xantana. O nitrogênio é um nutriente essencial tanto como componente orgânico ou como molécula inorgânica. (GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000). Resultados similares aos encontrados no nosso trabalho foram obtidos por Souw e Demain (1979). Segundo estes autores, quando o carbono e o fósforo são nutrientes limitantes, a produção de goma xantana aumenta. A concentração da fonte de carbono afeta a eficiência da conversão em polissacarídeos, sendo relatado na literatura que concentrações entre 1 – 5%, dão o melhor rendimento, enquanto que em concentrações mais altas de glicose, o rendimento do produto decresce (PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

A Figura 28 mostra os resultados experimentais da produção de goma xantana usando as duas fontes de nitrogênio.

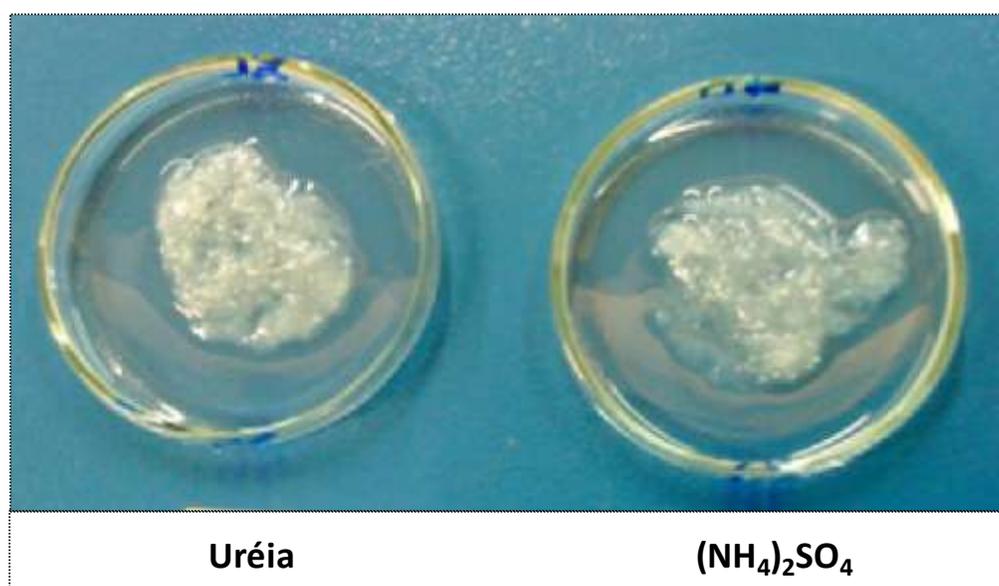


Figura 28 - Produção de goma xantana após 72 h de fermentação utilizando uréia ou sulfato de amônio como fontes de nitrogênio.

6.3.4. Comportamento do pH dos meios otimizados contendo sulfato de amônio e uréia como fontes de nitrogênio, ao longo do tempo de fermentação

A Tabela 25 mostra os valores de pH dos meios otimizados contendo sulfato de amônio e uréia como fontes de nitrogênio. Observa-se que em 72 h de fermentação, ambos meios contendo sulfato de amônio ou uréia como fonte de nitrogênio apresentaram o menor valor de pH, ao redor de 5,9.

Tabela 25 - Valores de pH dos meios constituídos por soro de queijo desproteinado suplementados com sulfato de amônio.

Tempo (h)	Valores de pH	
	Sulfato	Uréia
24	7,02	7,24
48	6,59	6,70
72	5,89	5,94

6.3.5. Produção de goma xantana excluindo do meio de cultivo as fontes de nitrogênio

Foram realizados testes com meios não suplementados com sulfato de amônio e/ou uréia como fontes de nitrogênio, baseados nos ensaios onde se obteve boa produção de goma, e cujos meios tinham baixas concentrações das fontes de nitrogênio. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 26 e 27.

Na Tabela 26, observa-se os resultados de produção de goma xantana, produção de biomassa, assim como os valores de lactose consumida e lactose remanescente em 24 h, 48 h e 72 h de fermentação para o meio, soro desproteinado suplementado com extrato de levedura. Os melhores resultados para produção de goma, foram obtidos em 72 h, pelos ensaios 4 e 5 que atingiram o mesmo valor de 23,28 g/L com rendimentos de 29% e 27%, respectivamente, e produtividade de $0,32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em ambos casos, no entanto, observa-se que a quantidade de lactose remanescente presente no meio é bastante alto. Observando o ensaio 1, vemos que a produção de goma foi de 18,72 g/L,

rendimento de 46% e mesmo que a produtividade não seja tão alta quanto os ensaios anteriormente mencionados, o consumo de lactose no meio é bastante elevado, o qual deixa um resíduo menos poluidor.

Funahashi, Yoshida e Taguchi (1987), estudaram o efeito da concentração de glicose na produção de goma xantana por *X. campestris* ATCC 13951. Segundo este estudo, concentrações de glicose entre 30 g e 40 g/Kg de meio consistem na melhor faixa de concentração para a produção de goma xantana. A possibilidade da adição intermitente de glicose de forma a manter seu teor no meio entre 30 e 40 g/Kg, preveniu a inibição do crescimento celular e da produção de goma. Através dessa alimentação estratégica de glicose, a concentração de goma xantana atingiu 43 g/Kg após 96 h de fermentação. A concentração ótima inicial de glicose foi considerada pelos autores como a de 40 g glicose/Kg de meio. Savvides, Katsifas e Hatzinikolaou (2012), encontraram melhor produção de goma xantana quando a solução equimolar de glicose e galactose foi de 43 g/L, no referente a fonte de carbono. Esta concentração foi a mais favorável também na produção de goma xantana em batelada, em outros estudos (DE VUYST e A., 1994).

A Tabela 27 mostra os resultados obtidos utilizando meio constituído apenas por soro de queijo desproteinado, e pode-se observar, que independente da concentração de lactose utilizada para produção de goma, foram obtidas cerca de 20 g/L após 72 h de fermentação ou seja, produção equivalente às obtidas com os meio suplementados (Tabela 24) com produtividade de $0,27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Em termos de rendimento foi o ensaio 1 o que obteve maior resultado com valor de 58%. Observando os resultados obtidos na produção de goma xantana utilizando só soro de queijo, pode-se concluir que a suplementação do soro é desnecessária, não havendo também a necessidade de concentrar o soro, uma vez que em concentrações altas de lactose não se obteve maiores produções de goma e a lactose remanescente no meio também é alta. Assim, a utilização de baixa concentração de lactose, além dos benefícios econômicos, traz também o benefício ao meio ambiente, visto ser o efluente menos poluidor.

Tabela 26 - Produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida (g/L) por *X. campestris* utilizando como meio soro desproteínado suplementado com extrato de levedura.

Ensaio	Lact. (g/L)	Ext. Lev. (g/L)	24 horas				48 horas				72 horas			
			Goma (g/L)	Biomass. (g/L)	Lact. Cons. (g/L)	Lact. Rem. (g/L)	Goma (g/L)	Biomass. (g/L)	Lact. Cons. (g/L)	Lact. Rem. (g/L)	Goma (g/L)	Biomass. (g/L)	Lact. Cons. (g/L)	Lact. Rem. (g/L)
1	44	3	4,20	0,78	14,99	29,01	14,04	0,90	30,03	13,97	18,72	0,30	40,36	3,64
2	62	3	6,24	1,20	23,89	38,11	15,60	1,62	38,56	23,44	18,84	0,72	49,96	12,04
3	89	3	6,96	1,92	36,14	52,86	16,92	2,64	50,38	38,62	22,56	1,68	62,80	26,20
4	116	3	7,32	2,10	54,75	61,25	19,68	4,68	64,90	51,10	23,28	3,60	80,50	35,50
5	133	3	9,12	2,46	72,88	60,12	17,88	4,56	81,10	51,90	23,28	5,70	86,21	46,79

Tabela 27 - Produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida (g/L) por *X. campestris* meio constituído apenas por soro de queijo desproteínado.

Ensaio	Lact. (g/L)	24 horas				48 horas				72 horas			
		Goma (g/L)	Biomass. (g/L)	Lact. Cons. (g/L)	Lact. Rem. (g/L)	Goma (g/L)	Biomass. (g/L)	Lact. Cons. (g/L)	Lact. Rem. (g/L)	Goma (g/L)	Biomass. (g/L)	Lact. Cons. (g/L)	Lact. Rem. (g/L)
1	44	6,48	0,48	16,66	27,34	17,88	0,96	32,66	11,34	19,68	0,18	33,89	10,11
2	62	5,40	1,56	22,76	39,24	17,52	0,66	39,83	22,17	19,80	0,18	47,10	14,90
3	89	6,84	1,44	36,54	52,46	17,76	2,58	47,88	41,12	19,68	0,66	61,61	27,39
4	116	10,20	2,22	48,56	67,44	14,28	3,60	67,02	48,98	19,68	1,86	80,80	35,20
5	133	7,32	2,10	60,84	72,16	13,32	3,54	76,92	56,08	19,44	3,78	86,46	46,54

A Tabela 28 resume os resultados de produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida, obtidos nos ensaios A (soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio), B (soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura) e C (soro de queijo desproteinado sem suplementação), a produção de goma em 72 h de fermentação para cada ensaio foi de 20,28 (g/L), 18,72 (g/L) e 19,68 (g/L) respectivamente, com produtividades de 0,28 g L⁻¹ h⁻¹, 0,26 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,27 g L⁻¹ h⁻¹.

Tabela 28 - Produção de goma, produção de biomassa e lactose consumida (g/L) por *X. campestris* em soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio, soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e soro de queijo desproteinado sem suplementação.

Ensaio	24 h			48 h			72 h		
	Goma (g/L)	Biomass. (g/L)	Lact. Cons. (g/L)	Goma (g/L)	Biomass. (g/L)	Lact. Cons. (g/L)	Goma (g/L)	Biomass. (g/L)	Lact. Cons. (g/L)
A	5,22	2,60	15,66	13,44	4,36	29,86	20,28	2,64	40,47
B	4,20	0,78	14,99	14,04	0,90	30,03	18,72	0,30	40,36
C	6,48	0,48	16,66	17,88	0,96	32,66	19,68	0,18	33,89

Ensaio A = soro desproteinado (lactose 44 g/L), extrato de levedura (3 g/L) e sulfato de amônio (1,5 g/L);

Ensaio B = soro desproteinado (lactose 44 g/L) e extrato de levedura (3 g/L);

Ensaio C = soro desproteinado (lactose 44 g/L).

A Tabela 28 e Figura 29 mostram que não houve grandes diferenças na produção de goma xantana após 72 h de fermentação para os três ensaios. Em relação ao rendimento, o ensaio C, constituído apenas de soro de queijo desproteinado atingiu valor de 58%, obtendo o rendimento mais alto entre os três ensaios em 72 h de análise. Este mesmo ensaio após 48 h de fermentação, já produziu cerca de 3 g/L de goma a mais que os outros meios, e apresentou boa qualidade de goma com rendimento de 55%. Por estes resultados, verifica-se mais uma vez que apenas o soro de queijo constitui bom meio para produção de goma xantana, visto ser a fração de compostos nitrogenados do soro, suficiente ao suplemento deste elemento à *X. campestris*.

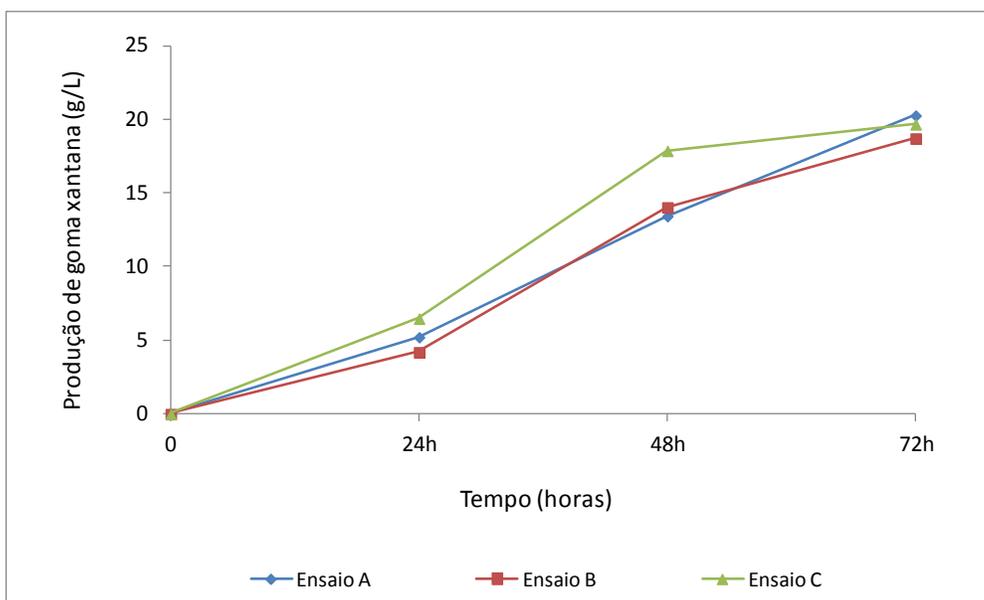


Figura 29 - Produção de goma xantana por *X. campestris* nos meios soro desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio (A); soro desproteinado suplementado com extrato de levedura (B) e soro desproteinado (C).

A Figura 30 mostra o aspecto de amostras de goma obtidas em 72 h de fermentação para os três meios estudados (Tabela 28).

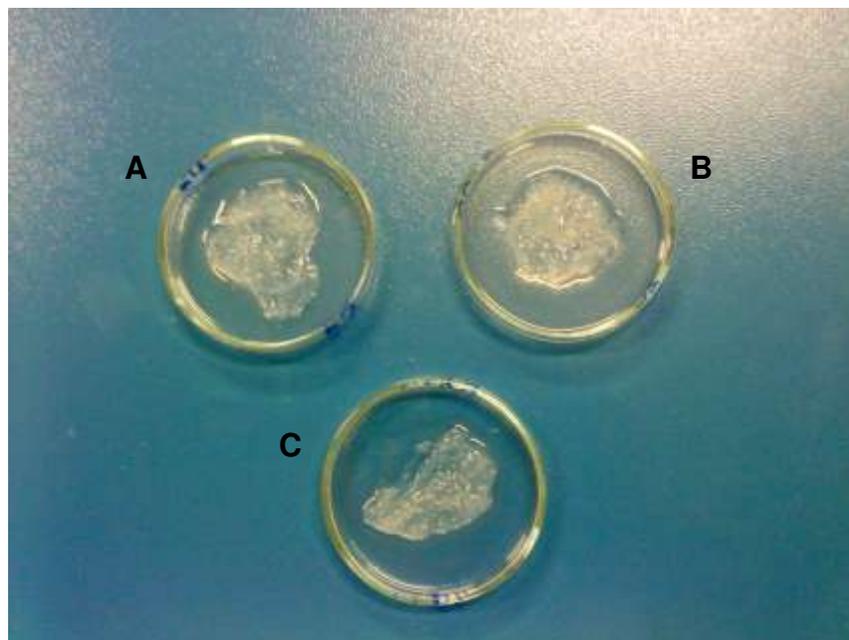


Figura 30 - Goma xantana produzida por *X. campestris* após 72 h de fermentação, para os meios A, B e C.

Nas Figuras 31 e 32 é mostrado o comportamento para a produção de biomassa e de lactose consumida durante o processo de fermentação de 72 h para os três meios em análise.

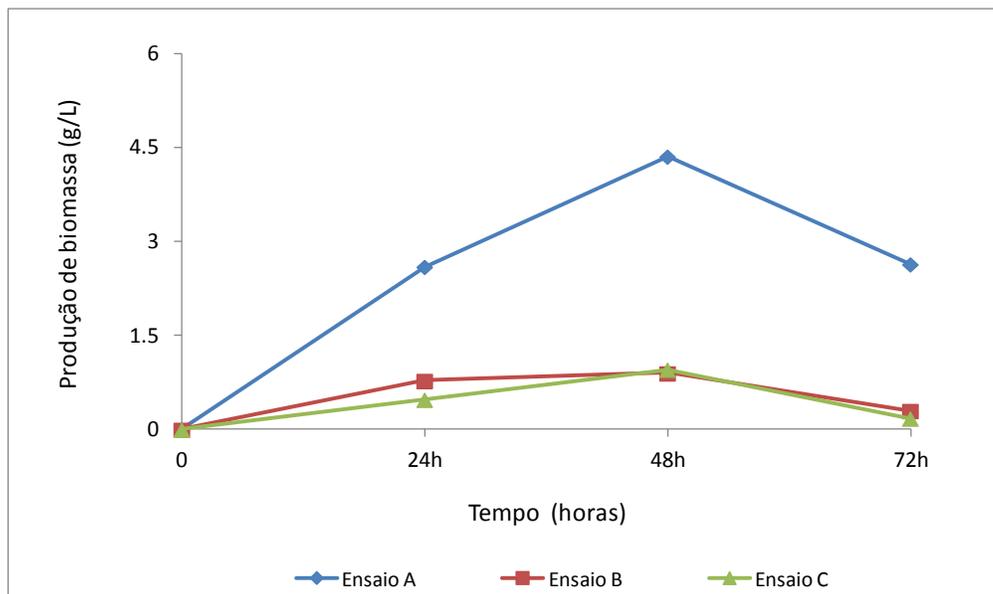


Figura 31 - Produção de biomassa na fermentação dos meios soro desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio (A); soro desproteinado suplementado com extrato de levedura (B) e soro desproteinado (C).

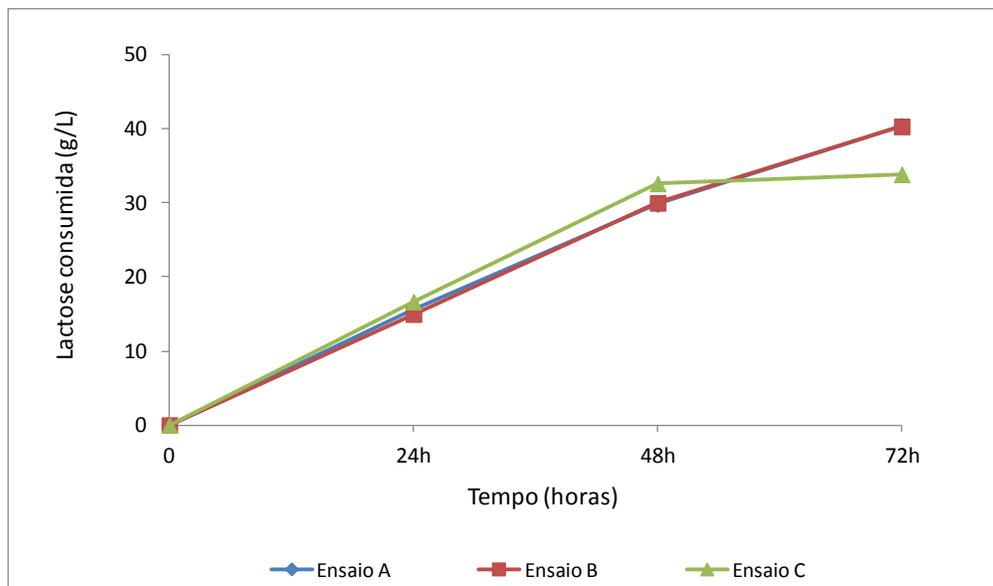


Figura 32 - Lactose consumida em fermentação dos meios soro desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio (A); soro desproteinado suplementado com extrato de levedura (B) e soro desproteinado (C).

A Tabela 29 mostra a variação dos valores de pH para os três meios: soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio; soro desproteinado de queijo suplementado com extrato de levedura e soro de queijo desproteinado. Observamos que após 72 h de fermentação, os valores de pH diminuíram em quase dos pontos para cada meio, sendo que a queda mais acentuada ocorreu no meio constituído apenas por soro, atingindo valor de pH 5,32.

Tabela 29 - Valores de pH dos meios: soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio; soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e soro de queijo despreteinado.

Tempo (h)	Valores de pH		
	A	B	C
24	7,02	7,18	7,19
48	6,59	6,68	5,93
72	5,89	5,99	5,32

A - soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura e sulfato de amônio

B - soro de queijo desproteinado suplementado com extrato de levedura

C - soro de queijo desproteinado

Ensaio preliminares indicaram o pH neutro como o melhor para produção de goma xantana, o que é relatado também na literatura. A Tabela 29 mostra diminuição do pH em função do tempo de fermentação para cada um dos ensaios em análise, com maior incidência no ensaio C, o qual atingiu no final do processo o menor valor de pH 5,32. A diminuição do pH durante a produção de goma xantana se deve à formação de grupos ácidos presentes na goma (GARCÍA OCHOA *et al.*, 2000).

Pode-se observar no presente trabalho mesmo que a produção de goma xantana utilizando soro de queijo como meio, não atingisse rendimentos e concentrações elevadas como os alcançados em meios convencionais (glicose e sacarose), a produção de goma xantana foi bastante razoável o que torna este processo atrativo por ser o soro de queijo um sub-produto de baixo custo e que muitas vezes é considerado como resíduo.

7. CONCLUSÕES

- A produção de goma xantana por *X. campestris* ATCC 13951 utilizando como meio soro de queijo desproteinado sem hidrolisar, mostrou que não era possível separar totalmente a goma produzida da massa celular conservando sempre parte de goma junto com a biomassa, o que determinou a necessidade de hidrolisar o meio.
- Em soro de queijo desproteinado e hidrolisado, já a partir de 24 h de fermentação observou-se produção de goma xantana, mas esta atingiu as melhores características de textura, consistência e elasticidade em 72 h de fermentação.
- A utilização de soro de queijo concentrado como meio, não aumentou a produção de goma xantana, pelo contrário gerou na maioria dos casos, valores baixos de produção de goma, diminuição pouco acentuada do pH e elevadas quantidades de lactose no meio ao final do processo.
- A produção de goma xantana por *X. campestris* ATCC 13951, utilizando soro de queijo desproteinado e hidrolisado, não necessitou de suplementos de extrato de levedura e sulfato de amônio, porque o próprio soro supriu todos os nutrientes necessários à bactéria, inclusive nitrogênio.
- Embora a concentração de goma xantana obtida a partir de soro de queijo não seja tão alta quanto às gomas obtidas utilizando fontes de carbono convencionais, este processo torna-se atraente porque o soro de queijo é um subproduto de baixo valor agregado e a goma xantana tem larga aplicação industrial em alimentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, T. C.; ROJAS, A. E. Biopolymers. In: NICOLETTI, T. V. (Ed.). **Biopolymer engineering in food processing**. 1st ed.: CRC Press, 2012. cap. 2, p.17-68.

ANTUNES, A. E. et al. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais alternativos: viscosidade x composição. **Rev. Bras. de Agrociência**, v. 6, n. 2, p. 123-125, 2000.

AZEVEDO, S. S.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Epidemiologia comparativa da Podridão Negra e da Alternariose do repolho na agreste de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 21-23, 2002.

BARRETO, R. T. N. et al. Biosynthesis of xanthan gum from the fermentation of milk whey: productivity and viscosity. **Química nova** v. 31, n. 8, p. 1937-1941, 2008.

BILANOVIC, D. et al. Lactic acid and xanthan fermentations on an alternative potato residues media – Carbon source costs. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2683-2689, 2011.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Xanthan gum: characteristics and operational conditions of production. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 171-188, 2008.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: (Ed.). **Biopolymers**. 1st. ed: Hardcover, v.5, 2003. p.259-291.

BRADBURY, J. F. Xanthomonas. In: KRIEG, N. R. H., J.G. (ED.) (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**: The Williams & Wilkins Co., Baltimore, v.1, 1984. cap. 11, p.199-210.

CHANDAN, R. C.; KILARA, A.; SHAH, N. P. **Dairy processing & quality assurance**. 1st ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2008,p.337-353.

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, n. 2–3, p. 206-211, 2003.

DE VUYST, L.; A., V. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 42, n. 2/3, p. 187-191, 1994.

DOBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K. **Biotreatment of industrial effluents**. 1st ed. Burlington, MA: Elsevier Butterworth-Heinemann, 2005,p.183-187.

DRAGONE, G. et al. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 929-935, 2009.

FAO. **Utilización del suero (secado por atomización en la producción de queso)**. Congreso FAO sobre la producción de queso, Valdivia-Chile.: 6; 22-29 p. 1978.

FONTANIELLA, B. et al. Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Chromatography B**, v. 770, n. 1–2, p. 275-281, 2002.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. 1st ed. London; New York: Blackie Academic & Professional, 1998,p.21-65.

FUNAHASHI, H.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. Effect of glucose concentrations on xanthan gum production by *xanthomonas campestris*. **Journal of fermentation technology**, v. 65, n. 5, p. 603-606, 1987.

GARCÍA, G.; QUINTERO, R.; LÓPEZ, M. **Biotecnología Alimentaria**. 1rd ed. Limusa S.A., 2004,p.435-439.

GARCÍA OCHOA, F.; CASTRO, E. G.; SANTOS, V. E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 9, p. 680-690, 2000.

GARCÍA OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Xanthan gum production: An unstructured kinetic model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 3, p. 206-217, 1995.

GARCÍA OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

GNANAMANICKAM, S. S. **Plant-associated bacteria**. 1st ed. Dordrecht: Springer, 2006, p. 535-542.

GREEN, M.; SHELEF, G.; BILANOVIC, D. The effect of various citrus waste fractions on xanthan fermentation. **The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 1, p. B37-B41, 1994.

GUPTA, M. D.; KAMAT, M. Y. Isolation of wild Xanthomonas strains from agricultural produce, their characterization and potential related to polysaccharide production. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 6, p. 621-628, 1997.

HORTON, B. S. Economics of marketing lactose and lactose by-products in a global trading environment. **International Dairy Federation, Brussels, in Bulletin 289.**, p. 7-9, 1993.

INDUSTRIAL, I. N. D. P. Disponível em: www.inpi.gov.br. 2007.

JANSSON, P.-E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from xanthomonas campestris. **Carbohydrate Research**, v. 45, n. 1, p. 275-282, 1975.

KALOGIANNIS, S. et al. Optimization of xanthan gum production by Xanthomonas campestris grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 249-256, 2003.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 81-84, 1998.

KENNEDY, J. F.; BRADSHAW, I. J. Production, properties and applications of xanthan. **Progress Ind. Microbiology**, v. 1, n. 19, p. 319-371, 1984.

KENNEDY, J. F. et al. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of Xanthomonas campestris cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n. 1, p. 39-43, 1982.

KIOSSEOGLU, A. et al. Functionality of medium molecular weight xanthan gum produced by *Xanthomonas Campestris* ATCC 1395 in batch culture. **Food Research International**, v. 36, n. 5, p. 425-430, 2003.

KONÍČEK, J.; KONÍČKOVÁ-RADOCHOVÁ, M. Use of whey for production of exocellular polysaccharide by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. **Folia Microbiologica**, v. 37, n. 2, p. 102-104, 1992.

KRISHNA LEELA, J.; SHARMA, G. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 23, n. 6, p. 687-689, 2000.

LIMA, U. D. A. et al. **Biotecnologia industrial**. 1ra ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2005, p.128-130.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola** 2nd ed. ACRIBIA EDITORIAL, 1996, p.454

LOPEZ, M. J.; RAMOS, C., A. Xanthan production from olive-mill wastewaters. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 38, n. 3-4, p. 263-270, 1996.

LÓPEZ, M. J. et al. Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates. **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 1, p. 111-115, 2004.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, P. R. Xanthan gum: Production, recovery, properties and application. **Estudos tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 50-67, 2009.

MCBEAN, L. D.; MILLER, G. D.; JARVIS, J. K. **Handbook of dairy foods and nutrition**. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2007, p.17-80.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, P. E. A. **Produção e projeção da produção de queijo no Brasil (Soro - Lactose)**. 2009

MORAINE, R. A.; ROGOVIN, P. Xanthan biopolymer production at increase concentration by pH control. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 13, n. 3, p. 381-391, 1971.

MORENO, J. et al. Use of agricultural wastes for xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4-5, p. 242-246, 1998.

NAVARRETE, R. C. New Biopolymer for coiled tubing applications. In: (Ed.). **International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 68487, Houston, 2001. Anais... Houston, 2001.** p.1-10.

NAVARRETE, R. C.; SEHEULT, J. M.; COFFEY, M. D. New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer, and coil-tubing fluid, Part II. In: (Ed.). **International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 64982, Houston, 2001. Anais... Houston, 2001.** p.1-15.

NAVARRETE, R. C. S., J. M.; COFFEY, M. D. New Biopolymer for drilling, drill-in, completions spacer fluids and coiled tubing applications. In: (Ed.). **International Symposium on Oilfield Chemistry IADC/SPE 62790, Houston, 2000. Anais...Houston, 2000,** 2000. p.1-17.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo a base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C7L1. **Ciência Tecnologia e Alimentação** v. 21, n. 1, p. 82-85, 2001.

NUSSINOVITCH, A. **Hydrocolloid applications : gum technology in the food and other industries.** 1st ed. London; New York: Blackie Academic & Professional, 1997,p.154-168.

OLIVEIRA, L. H. S. et al. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de goma xantana. **Revista Científica Plural**, v. 1, n. 2, p. 115-120, 2000.

ONWULATA, C.; HUTH, P. **Whey processing, functionality and health benefits.** 1st ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2008,p.1-14; 369-390.

ORENTAS, D. G.; SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Pyruvic acid content and constituent sugars of exocellular polysaccharides from different species of the genus *Xanthomonas*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 427-430, 2013/06/07 1963.

PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v. 106, n. 1, p. 1-12, 2011.

PANESAR, P. S. et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 1-14, 2007.

PAPAGIANNI, M. et al. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 73-80, 2001.

PORTILHO, M. **Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por duas linhagens de *Agrobacterium* sp.** 2002. 86 Tese de doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, UNICAMP, Campinas SP.

QUINN, F. X. Xanthan Gum (Overview). In: SALAMONE, J. C. (Ed.). **Concise Polymeric Materials Encyclopedia**: Boca Raton, 1999. p.1652-1653.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 578-592, 2010.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 197-207, 2006.

ROTTAVA, I. Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Campus de Erechim.**, p. 4-23, 2005.

ROTTAVA, I. et al. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 65-71, 2009.

SAVVIDES, A. L.; KATSIFAS, E. A.; HATZINIKOLAOU, D. G. Xanthan production using whey permeate medium. **World J Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 2759-2764, 2012.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W. L., U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. 1a. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, v.2, 2001. p.5-18.

SHU, C.-H.; YANG, S. T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 35, p. 454-468, 1990.

SILVA, J. A. L.; RAO, M. A. Role of rheological behavior in sensory assessment of fluid foods. In: RAO, M. A. (Ed.). **Rheology of fluid and semisolid foods : principles and applications** Gaithersburg, Md. : Aspen Publishers, 1999. p.433.

SILVA, M. F. et al. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 119-123, 2009.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey. **A review. Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: Part I. Constitution. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 2066-2071, 2013/06/07 1962.

SOUW, P.; DEMAIN, A. L. Nutritional Studies on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and environmental microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, June 1979.

SOUW, P.; DEMAIN, A. L. Role of Citrate in Xanthan Production by *Xanthomonas campestris*. **Journal of fermentation technology**, v. 58, n. 5, p. 411-416, 1980.

SOUZA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv *pruni* CEPAS 24 e 58. **Ciência e Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 115-123, 1999.

SOUZA, J. D. et al. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 8, p. 1761-1776, 2012.

SPREER, E. **Milk and dairy product technology**. 2nd ed. New York, NY [u.a.]: Marcel Dekker, 1998,p.527-547.

STREDANSKY, M.; CONTI, E. Xanthan production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 6–7, p. 581-587, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 12, n. 2, p. 393-448, 1994.

SUTHERLAND, I. W. Biotechnology of Microbial Polysaccharides in Food. In: SHETTY, K., *et al* (Ed.). **Food Biotechnology**. 2nd ed.: CRC Press 2005.

SUTHERLAND, I. W.; JEON, K. W.; FRIEDLANDER, M. Bacterial Surface Polysaccharides: Structure and Function. In: (Ed.). **International Review of Cytology**. Volume 113: Academic Press, 1988. p.187-231.

SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L.; SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: (Ed.). **Xanthomonas**: Springer Netherlands, 1993. p.363-388.

TAIT, M. I.; SUTHERLAND, I. W.; CLARKE-STURMAN, A. J. Effect of growth condition on the production, composition and viscosity of Xanthomonas campestris exopolisaccharide. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 1483-1492, 1986.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005,p.920.

VALENCIA, D. E.; RAMIREZ, C. M. L. La Industria de la leche y la contaminación del agua. p. 27-31, 2009.

VEISSEYRE, R.; VENTANAS, B. J. **Lactología técnica : composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche**. 2a ed. Zaragoza: Acribia, 1988,p.457-460.

WAITES, M. J. **Industrial microbiology : an introduction**. 1st ed. Oxford [u.a.]: Blackwell Science, 2001,p.24; 52; 76-77; 160-163.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006,p.17-25.

WANG, L. K. **Waste treatment in the food processing industry**. 1st ed. Boca Raton, Fla.: Taylor & Francis, 2006,p.1-25.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. **Industrial gums : polysaccharides and their derivatives**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1993,p.342-371.

WYATT, N. B.; LIBERATORE, M. W. Rheology and viscosity scaling of the polyelectrolyte xanthan gum. **J Appl Polym Sci**, v. 114, n. 6, p. 4076-4084, 2009.

YOO, S. D.; HARCUM, S. W. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 105-109, 1999.