Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia Química Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Produção de goma xantana em reator de coluna de bolha utilizando processo de batelada repetida

Érika Durão Vieira

Orientador: Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Campinas - São Paulo

Agosto de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

V673p	Vieira, Érika Durão Produção de goma xantana em reator de coluna de bolha utilizando processo de batelada repetida / Érika Durão VieiraCampinas, SP: [s.n.], 2008.
	Orientador: Silvio Roberto Andrietta. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	 Gomas e resinas. Polissacarideos microbianos. Biotecnologia - Industrial. Bacterias fitopatogenicas. Andrietta, Silvio Roberto. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Título.

Titulo em Inglês: Xanthan gum production in a bubble column reactor using a repeated batch process Palavras-chave em Inglês: Xanthan gum, Xanthomonas campestris, Bubble column, Repeated batch Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos Titulação: Doutor em Engenharia Química Banca examinadora: Maria Helena Andrade Santana , Francisco Maugeri Filho, Luis Carlos Basso, Daniel Ibraim Pires Atala, Cláudia Steckelberg Data da defesa: 22/08/2008 Programa de Pós Graduação: Engenharia Química Tese de Doutorado defendida por Érika Durão Vieira e aprovada em 22 de agosto de 2008 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta (Orientador)

110

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

OLB 70505

Prof. Dr. Luis Carlos Basso

Dr. Daniel Ibraim Pires Atala

Dra. Cláudia Steckelberg

Este exemplar corresponde à versão da final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta (Orientador)

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, meus pais, Mário e Tereza, meus irmãos, Mário, Marcelo e Sandra e ao meu companheiro, Denis. Por todo o amor incondicional que me deram ao longo desta jornada.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a esta força maior que governa o universo, uns chamam de Deus, outros de Natureza, ou simplesmente a VIDA...esta jornada percorrida ao longo de 3 anos e meio em que estive na UNICAMP e no CPQBA, certamente, ensinou não só experiência técnica, profissional, mas pessoal, experiência de vida.

Agradeço a minha família enormemente pelo apoio nas horas difíceis mesmo estando tão longe. Agradeço à companhia preciosa e a força do meu companheiro Denis durante esta jornada tanto durante a execução dos ensaios quanto na escrita desta tese.

Ao meu orientador, Silvio Roberto Andrietta, agradeço a amizade, o incentivo, o apoio e a confiança na execução deste trabalho e por dar o exemplo de que se pode executar bem uma tarefa sem precisar atingir a perfeição.

Agradeço às queridas amigas Maria da Graça Andrietta, Cláudia Steckelberg, Milene Oliveira e Gisele Tosetto e ao querido amigo Klauss Franz pela amizade e companheirismo durante a convivência por 5 anos e meio no CPQBA. Agradeço também a amizade daqueles com quem convivi por um período menor ao longo destes anos: Lia Mendonça, Nayara Zago, Denise Aquino e Gabriel Galassi. Aos companheiros de disciplinas, Arlete Barbosa dos Reis, Ana Paula, Roberto, Taciana e Emmanuele.

Especial agradecimento faço aos professores da pós-graduação da FEQ e da FEA que com suas aulas maravilhosas me inseriram no mundo da química de proteínas, das enzimas, da recuperação de bioprodutos, da reologia e do encapsulamento. São eles: Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, Profa. Dra. Telma Teixeira Franco, Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha e Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana a quem, particularmente e imensamente, agradeço a atenção dispensada em períodos tão delicados durante estes anos em que estive vinculada a FEQ. Agradeço aos meus tutores do PED, à Profa. Dra. Thereza Kakuta e ao Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto que me guiaram nos primeiros passos da docência.

Pela oportunidade única de ter levado um projeto de escala de laboratório para escala piloto, agradeço ao engenheiro de alimentos e consultor Guiraldini, ao engenheiro químico

Rogério e o biólogo João Antônio Prudenciatti que constituíram, juntamente comigo e o Dr. Silvio Andrietta, a equipe do projeto xantana idealizada pela Açucareira Corona.

Agradeço aos meus queridos amigos do INPI, Sônia, Sérgio, Maria Helena, Adriano, Alexandre, Clarice, Simone, Francileide, Vivian, Douglas e Airton por todo o carinho e amizade dispensados em 1 ano e meio de convivência. De uma forma muito especial, agradeço a grande amiga Romi Lambi Machado que reencontrei no INPI em 2006 depois de tê-la conhecido em 2001 quando eu vim da Bahia e ela do Rio Grande do Sul para fazer mestrado na FEQ/UNICAMP.

Agradeço à minha atual gestora na Biorigin, Rosangela Contieri, que conheci no curso de planejamento de experimentos da Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues em dezembro de 2005, pela compreensão nesta fase tão delicada em que mudei de emprego e cidade para abraçar um sonho e retomar a escrita da tese com muito mais motivação.

Agradeço à instituição CAPES pelo apoio financeiro por meio da concessão da minha bolsa de doutorado.

Finalmente, agradeço novamente à VIDA que, através de todas estas pessoas, me mostrou que cada um faz o que pode com o que tem e, nem por isso, ninguém é menos nem mais que alguém, cada um é do tamanho que lhe cabe e é responsável por dar o seu melhor. E aí está a beleza da VIDA! "O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que é. Se insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa, é possível que acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la. Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la, mesmo que não a tenha no começo."

Gandhi

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de produção de goma xantana em reator de coluna de bolha utilizando processo de batelada repetida bem como otimizar as condições de produção e avaliar algumas etapas típicas da recuperação da goma. Foram utilizadas neste estudo duas linhagens da bactéria Xanthomonas campestris: ATCC 13951 (ou NRRL B-1459) e ATCC 55298. Os ciclos variaram de 3 a 8 bateladas consecutivas de 48 horas. Ao final de cada batelada, parte do caldo fermentado era retirado do reator e aproximadamente 20% do volume era deixado no reator para servir de inóculo para a próxima batelada que se iniciava com a adição de meio para produção de goma. O primeiro ensaio preliminar que consistiu de um ciclo com 6 bateladas demonstrou ser viável o processo em bateladas repetidas de modo que ensaios subseqüentes foram realizados com a finalidade de se otimizar as condições de operação para cada linhagem por planejamento fatorial de dois níveis em configuração estrela com repetição do ponto central. Os fatores estudados foram concentração inicial de sacarose, vazão de ar e temperatura e as respostas analisadas foram rendimento, concentração final de xantana bruta e o índice de consistência k (mPa.sⁿ), parâmetro reológico indicativo da qualidade da goma produzida. De uma maneira geral, os fatores estudados não apresentaram efeitos significativos nas respostas estudadas. Nos ensaios do planejamento fatorial, para a linhagem ATCC 13951, obteve-se valores médios de 10,7±1,9 g/L para a concentração final de xantana, 48,6±14,3% para o rendimento, 1228±310 mPa.sⁿ para o índice de consistência e 0,29±0,022 para o índice de comportamento de fluxo. Para a linhagem ATCC 55298 obtevese valores médios de 11,1±1,6 g/L para a concentração final de xantana, 50,5±11,7% para o rendimento, 1478±223 mPa.sⁿ para o índice de consistência e 0,27±0,016 para o índice de comportamento de fluxo. A análise dos resultados por meio da função desejabilidade global apontou condições ótimas de trabalho que foram validadas experimentalmente. Os ensaios de validação, tanto com a linhagem ATCC 13951 quanto com a linhagem ATCC 55298, apontaram que a concentração inicial de sacarose em 20 g/L, temperatura de 31°C e aeração de 1,5 vvm maximizam rendimento e concentração final de xantana.

Palavras-chave: Xanthomonas campestris, goma xantana, coluna de bolha, batelada repetida

Abstract

The aim of this work is to evaluate xanthan production in a bubble column reactor using a repeated batch process as well as to optimize de gum production operational conditions and evaluate some of the typical steps of the recovery process. Two Xanthomonas campestris strains were evaluated: ATCC 13951 (or NRRL B-1459) and ATCC 55298. The cycles were comprised of 3 to 8 repeated 48-hour batches. At the end of each batch 20% of the broth volume was left inside the fermentor to serve as innoculum to the next bacth that were initiated by addition of fresh medium. Preliminary experimental assay showed satisfactory results in a cycle with six 48-hour successive batches so that subsequent assays were conducted to optimize the operational conditions for each strain using two level factorial design plus star configuration with three central point replicates. The factors evaluated were the initial sucrose concentration, temperature and aeration and the responses were the final xanthan concentration, the overall yield and the consistency index. The evaluated factors did not presented significant effect on the responses studied. The mean values obtained in the assays with strain ATCC 13951 were 10.7 ± 1.9 g/L to final xanthan concentration, 48.6±14.3% to the overall yield, 1228±310 mPa.sn to the consistency index and 0.29±0.022 to the flow behavior index. The mean values obtained in the assays with strain ATCC 55298 were 11.1±1.6 g/L to final xanthan concentration, $50.5\pm11.7\%$ to the overall yield, 1478 ± 223 mPa.sn to the consistency index and 0.27 ± 0.016 to the flow behavior index. The analysis of the factorial design results through desirability function pointed the optimal conditions to maximize yield and product quality and these conditions were validated experimentally. It was concluded that for both strains, the optimal conditions were 20g/L initial sucrose, 31°C and 1.5 vvm.

Key-words: Xanthomonas campestris; xanthan; bubble column; repeated batch

SUMÁRIO

1	INTROL	DUÇÃO1
2	OBJETI	VOS4
3	REVISÃ	O BIBLIOGRÁFICA5
	3.1 XA	NTANA5
	3.1.1	Microrganismo produtor
	3.1.2	Estrutura e Propriedades
	3.1.3	Biossíntese9
	3.1.4	Reologia11
	3.1.5	Aplicações e mercado19
	3.2 Pro	DDUÇÃO DE XANTANA
	3.2.1	Requerimentos nutricionais
	3.2.2	Cinética da fermentação26
	3.2.3	Processos e tipos de reatores
	3.2.4	Recuperação32
4	MATER	IAL E MÉTODOS
	4.1 Mie	CRORGANISMO
	4.1.1	Conservação
	4.1.2	Pré-Inóculo e Inóculo
	4.2 Pro	DCESSO EM BATELADA REPETIDA
	4.2.1	Escala laboratório
	4.2.2	Escala piloto
	4.3 Red	CUPERAÇÃO DA GOMA
	4.4 DE	TERMINAÇÃO DA BIOMASSA42
	4.4.1	Ensaio Biomassa 144
	4.4.2	Ensaio Biomassa 245
	4.4.3	Ensaio Biomassa 345
	4.4.4	Ensaio Biomassa 445
	4.4.5	Ensaio Biomassa 5

	4.5	Det	TERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS	45
	4.5	5.1	Preparo da Amostra	46
	4.5	5.2	Análise Reológica	47
	4.6	Ens	AIO DE ESTABILIDADE TÉRMICA DA GOMA XANTANA	48
	4.7	Ens	AIO PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENTES AGENTES PRECIPITANTES	50
	4.8	Mé	fodos Analíticos	51
	4.8	3.1	Determinação de sacarose	51
	4.9	ME	TODOLOGIA PARA OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO	53
	4.9	9.1	Planejamento fatorial	53
	4.9	9.2	Análise por meio de superfícies de resposta	54
	4.9	9.3	Função desejabilidade	56
5	RES	ULT	ADOS E DISCUSSÕES	59
	5.1	AV	ALIAÇÃO DO AGENTE PRECIPITANTE	59
	5.2	Det	TERMINAÇÃO DA BIOMASSA DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS	65
	5.2	2.1	Cinética de crescimento	66
	5.2	2.2	Absorbância do fermentado	68
	5.3	REC	JIÃO DE CISALHAMENTO CÁLCULO DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS	83
	5.4	Est	ABILIDADE TÉRMICA	87
	5.5	Prc	DUÇÃO DE XANTANA POR PROCESSO DE BATELADA REPETIDA	90
	5.5	5.1	Ensaio preliminar	91
	5.5	5.2	Ensaios de otimização	96
	5.5	5.3	Ensaios de validação	138
	5.6	Prc	DUÇÃO DE XANTANA POR PROCESSO DE BATELADA REPETIDA (PILOTO)	156
6	CON	ICLI	USÕES	161
7	SUG	EST	ÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	162
8	REF	'ERÊ	NCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA DA MOLÉCULA DA XANTANA (GARCIA-OCHOA ET AL., 2000)	8
FIGURA 2 – MODELO MECANÍSTICO PARA A SINTESE DA XANTANA PROPOSTO POR VORHÖLTER	
ET AL. (2008)	10
FIGURA 3 – CURVAS DE FLUXO TÍPICAS DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO PURAMENTE	
VISCOSO (ADAPTADO DE STEFF, 1996)	12
FIGURA 4 - CURVAS DE VISCOSIDADE TÍPICAS DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO PURAMENTE	
VISCOSO (ADAPTADO DE STEFFE, 1996)	12
FIGURA 5 - CURVA DE FLUXO DE UM FLUIDO PSEUDOPLÁSTICO EVIDENCIANDO AS REGIÕES	
NEWTONIANAS DE ALTA E BAIXA VISCOSIDADE (ADAPTADO DE STEFFE 1996)	14
FIGURA 6 – ILUSTRAÇÃO DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS (1,6) E (1,4) COM INDICAÇÃO DAS	
POSSÍVEIS ROTAÇÕES INTRAMOLECULARES E DAS CONFORMAÇÕES EM FITA	
FLEXÍVEL E FITA ESTENDIDA	15
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA CONCEBIDO POR FLORES	
CANDIA E DECKWER (1999)	23
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE XANTANA INCLUINDO ETAPA DE	
ULTRAFILTRAÇÃO SEGUNDO	35
FIGURA 9 - PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO INÓCULO	38
FIGURA 10 - SISTEMA OPERACIONAL: (1) REATOR DE VIDRO ENCAMISADO, (2) BANHO	
TERMOSTÁTICO, (3) ROTÂMETRO, (4) BOMBAS PERISTÁLTICAS - (A) ENTRADA DE	
MEIO, (B) ENTRADA DE ANTIESPUMANTE E (C) SAÍDA DE FERMENTADO -, (5) FILTROS	
DE AR, (6) TANQUE PULMÃO E (7) ANTI-ESPUMANTE	40
FIGURA 11 - ESQUEMA DOS ENSAIOS	41
FIGURA 12 - PROCEDIMENTO PARA RECUPERAÇÃO DA GOMA	42
FIGURA 13 - VISCOSÍMETRO OFITE 900	48
FIGURA 14 – PERFIL DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE (DERRINGER AND SUICH, 1980)	57
FIGURA 15 - XANTANA BRUTA RECUPERADA DO CALDO FERMENTADO EM FUNÇÃO DA	
NATUREZA E PROPORÇÃO DO AGENTE PRECIPITANTE	59
FIGURA 16 - PERCENTUAL DE GOMA XANTANA BRUTA RECUPERADA EM FUNÇÃO DA	
NATUREZA E PROPORÇÃO DO AGENTE PRECIPITANTE	60
FIGURA 17 - ASPECTOS DA PRECIPITAÇÃO DA XANTANA DO FERMENTADO UTILIZANDO	
ETANOL – (A) FRASCO X4 CALDO FERMENTADO APÓS TRATAMENTO TÉRMICO E	
BECKER X3 GOMA XANTANA REDILUÍDA APÓS PRECIPITAÇÃO; (B), (C) E (D) GOMA	
XANTANA REPRECIPITADA COM ETANOL	61
FIGURA 18 - TEOR DE SACAROSE NA XANTANA BRUTA - (A) EM FUNÇÃO DA SACAROSE	
RESIDUAL NO FERMENTADO E (B) EM FUNÇÃO DA RAZÃO DA MASSA SACAROSE	
RESIDUAL NO FERMENTADO POR MASSA DE XANTANA RECUPERADA DO CALDO	64
FIGURA 19 - HISTOGRAMA E NORMAL P-PLOT PARA OS DADOS DO PERCENTUAL DE SACAROSE	
NA XANTANA BRUTA	65

FIGURA 20 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO (A -	
ENSAIO 1), VOLUME DE INÓCULO (B - ENSAIO 2), VOLUME DE INÓCULO E TEMPO DE	
INCUBAÇÃO (C - ENSAIO 3) E TEMPO DE INCUBAÇÃO (D - ENSAIO 5).	67
FIGURA 21 - ABSORBÂNCIA A 540 NM E 600 NM EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA	69
FIGURA 22 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 540 NM E 600 NM	
(ENSAIO 1)	70
FIGURA 23 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 540 NM E 600 NM	
(ENSAIO 2)	70
FIGURA 24 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 540 NM E 600 NM	
(ENSAIO 3)	70
FIGURA 25 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 540 NM E 600 NM	
(ENSAIO 5)	71
FIGURA 26 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DILUÍDA (X/D) EM FUNÇÃO DA	
ABSORBÂNCIA DO FERMENTADO DILUÍDO A 540 NM	72
FIGURA 27 - ABSORBÂNCIA DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE XANTANA A 540 NM E 600 NM	73
FIGURA 28 - VALORES PREDITOS VERSUS OBSERVADOS PARA A BIOMASSA OBTIDOS NO ENSAIO	
3: (A) ABSORBÂNCIA A 540 NM E (B) ABSORBÂNCIA A 600 NM	77
FIGURA 29 - DESCONTO DA INFLUÊNCIA DA XANTANA NA MEDIDA DE ABSORBÂNCIA DO	
FERMENTADO	78
FIGURA 30 - VALORES PREDITOS VERSUS OBSERVADOS PARA A BIOMASSA OBTIDOS NO ENSAIO	
5: (A) E (B) ABSORBÂNCIA A 540 NM E (C) E (D) ABSORBÂNCIA A 600 NM	82
FIGURA 31 - CURVA DE VISCOSIDADE DE UMA SOLUÇÃO DE XANTANA (0,43% P/V) GRAU	
ALIMENTÍCIO E GRAU INDUSTRIAL DA CP KELCO	85
FIGURA 32 - CURVA DE ESCOAMENTO DE UMA SOLUÇÃO DE XANTANA (0,43% P/V)	85
FIGURA 33 - REGIÕES DE BAIXAS E ALTAS TAXAS DE CISALHAMENTO	86
FIGURA 34 - REGIÃO INTERMEDIÁRIA DE TAXA DE CISALHAMENTO	87
FIGURA 35 - PARÂMETROS REOLÓGICO DO FERMENTADO ANTES E APÓS DIFERENTES	
CONDIÇÕES DE TRATAMENTO TÉRMICO	88
FIGURA 36 - PARÂMETROS REOLÓGICOS DAS SOLUÇÕES DE XANTANA OBTIDA NAS	
DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO TÉRMICO	89
FIGURA 37 - FOTOGRAFIAS EVIDENCIANDO ASPECTOS CARACTERÍSTICOS DO PROCESSO DE	
PRODUÇÃO DE GOMA	90
FIGURA 38 - PERFIL DE CONSUMO DE SUBSTRATO EM CADA BATELADA	92
FIGURA 39 - PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE A CADA 24 HORAS AO LONGO DE UM	
CICLO	93
FIGURA 40 – VALORES DE (A) RENDIMENTO E (B) CONCENTRAÇÃO DE XANTANA OBTIDOS EM	
24H E 48H NO ENSAIO PRELIMINAR	94
FIGURA 41 - PARÂMETROS REOLÓGICOS DA XANTANA BRUTA	95
FIGURA 42 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE: PLANEJADA, NO MOSTO E NA HORA	
ZERO DA FERMENTAÇÃO (NRRL B-1459*)	98
FIGURA 43 - HISTOGRAMA E BOX PLOT PARA OS VALORES DA RESPOSTA CONCENTRAÇÃO	
FINAL DE XANTANA (NRRL B-1459*)	100

FIGURA 44 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS REFERENTES AO MODELO COMPLETO PARA A	
RESPOSTA RENDIMENTO (NRRL B-1459*)	101
FIGURA 45 – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA O RENDIMENTO (NRRL B-1459*)	103
FIGURA 46 – CONCENTRAÇÃO E RENDIMENTO FINAL DE XANTANA E CONCENTRAÇÃO DE	
SACAROSE NA HORA ZERO EM CADA BATELADA (NRRL B-1459*)	104
FIGURA 47 - BOX PLOT PARA OS VALORES DA RESPOSTA RENDIMENTO (NRRL B-1459*)	105
FIGURA 48 - RENDIMENTO EM XANTANA, CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA HORA ZERO E	
CONCENTRAÇÃO DE XANTANA OBTIDOS NOS ENSAIOS DO PONTO CENTRAL	106
FIGURA 49 - HISTOGRAMA E BOX PLOT PARA OS VALORES DA RESPOSTA K (NRRL B-1459*)	107
FIGURA 50 – PERFIL DAS RESPOSTAS E FUNÇÃO DESEJABILIDADE PARA CADA FATOR	
ESTUDADO (NRRL B-1459*)	108
FIGURA 51 – CURVAS DE CONTORNO DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE (NRRL B1459*)	109
FIGURA 52 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA	
CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H (ATCC 13951)	111
FIGURA 53 - BOX PLOT PARA OS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H (ATCC 13951)	112
FIGURA 54 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA	
RENDIMENTO (ATCC 13951)	113
FIGURA 55 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE: PLANEJADA, NO MOSTO E NA HORA	
ZERO DA FERMENTAÇÃO (ATCC 13951)	114
FIGURA 56 - BOX PLOT PARA OS VALORES DE RENDIMENTO (ATCC 13951)	115
FIGURA 57 - BOX PLOT PARA OS VALORES DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA (ATCC 13951)	116
FIGURA 58 – PERFIL DAS RESPOSTAS E FUNÇÃO DESEJABILIDADE PARA CADA FATOR	
ESTUDADO (ATCC 13951)	117
FIGURA 59 – CURVAS DE CONTORNO DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE (ATCC 13951)	118
FIGURA 60 - BOX PLOT PARA COMPARAÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA E	
DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA (NRRL B-1459* VERSUS ATCC 13951)	120
FIGURA 61 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO COMPLETO PARA CONCENTRAÇÃO	
DE XANTANA 48H	122
FIGURA 62 - BOX PLOT PARA OS VALORES DE P (ATCC 55298)	123
FIGURA 63 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO COMPLETO PARA A VARIÁVEL R	
(ATCC 55298)	124
FIGURA 64 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE: PLANEJADO (S), NO MOSTO E NA	
HORA ZERO DA FERMENTAÇÃO (ATCC 55298)	124
FIGURA 65 - VARIÁVEIS R, P E S _{0H} PARA CADA BATELADA (ATCC 55298)	125
FIGURA 66 - BOX PLOT PARA OS VALORES DA RESPOSTA R (ATCC 55298)	126
FIGURA 67 - GRÁFICO DE PARETO DO MODELO COMPLETO PARA A VARIÁVEL K (ATCC 55298)	127
FIGURA 68 - GRÁFICO DE PARETO DO MODELO DE 8 PARÂMETROS PARA A VARIÁVEL K (ATCC	
55298)	128
FIGURA 69 - BOX PLOT PARA OS VALORES DA RESPOSTA K (ATCC 55298)	129
FIGURA 70 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA O ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA, K (ATCC 55298)	130
FIGURA 71 – PERFIL DAS RESPOSTAS E FUNÇÃO DESEJABILIDADE PARA CADA FATOR	
ESTUDADO (ATCC 55298)	132
FIGURA 72 - CURVAS DE CONTORNO DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE (ATCC 55298)	133

FIGURA 73 – PERFIL DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS AO LONGO DOS CICLOS OBTIDOS NOS	
ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL (ATCC 13951)	136
FIGURA 74 – PERFIL DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS AO LONGO DOS CICLOS OBTIDOS NOS	
ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL (ATCC 55298)	137
FIGURA 75 – PERFIL CINÉTICO DE CADA CICLO NO ENSAIO DE VALIDAÇÃO (ATCC 13951)	139
FIGURA 76 - RENDIMENTO E Y [*] _{X/S} DE CADA BATELADA DO ENSAIO DE VALIDAÇÃO (ATCC 13951)	141
FIGURA 77 – PERFIS DA CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA, DE XANTANA E DE SACAROSE NOS	
TEMPOS 0H, 24H E 48H EM FUNÇÃO DE CADA BATELADA AO LONGO DOS CICLOS	
(ENSAIO DE VALIDAÇÃO - ATCC 13951)	144
FIGURA 78 - PERFIS DA CONCENTRAÇÃO DE GOMA XANTANA 48H (A), DOS PARÂMETROS	
REOLÓGICOS DO FERMENTADO 48H (B) E DA GOMA XANTANA RECUPERADA (C) EM	
FUNÇÃO DE CADA BATELADA AO LONGO DOS CICLOS (ENSAIO DE VALIDAÇÃO -	
ATCC 13951)	146
FIGURA 79 – PERFIL CINÉTICO DE CADA CICLO NO ENSAIO DE VALIDAÇÃO (ATCC 55298)	148
FIGURA 80 – RENDIMENTO E Y [*] _{X/S} DE CADA BATELADA DO ENSAIO DE VALIDAÇÃO (ATCC 55298)	150
FIGURA 81 - PERFIS DA CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA, DE XANTANA E DE SACAROSE NOS	
TEMPOS 0H, 24H E 48H EM FUNÇÃO DE CADA BATELADA AO LONGO DOS CICLOS	
(ENSAIO DE VALIDAÇÃO - ATCC 55298)	151
FIGURA 82 - PERFIS DA CONCENTRAÇÃO DE GOMA XANTANA 48H (A), DOS PARÂMETROS	
REOLÓGICOS DO FERMENTADO 48H (B) E DA GOMA XANTANA RECUPERADA (C) EM	
FUNÇÃO DE CADA BATELADA AO LONGO DOS CICLOS (ENSAIO DE VALIDAÇÃO -	
ATCC 55298)	154
FIGURA 83 - PERFIL CINÉTICO DAS BATELADAS 01/01 E 01/02	156
FIGURA 84 – PERFIL CINÉTICO DAS BATELADAS 01/03 A 06/03	158

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES DE K, N E τ_0 PARA CADA TIPO DE FLUIDO	13
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO YM	37
TABELA 3 - MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA	38
TABELA 4 - RELAÇÃO ENTRE ROTAÇÃO E TAXA DE CISALHAMENTO DO VISCOSIMETRO OFITE	
900	48
TABELA 5 - DEFINIÇÃO E NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS	53
TABELA 6 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: 8 PONTOS FATORIAIS, 6 PONTOS AXIAIS E 3	
REPETIÇÕES DO PONTO CENTRAL	54
TABELA 7 - ORDEM DE EXECUÇÃO DOS ENSAIOS	55
TABELA 8 - TEOR DE SACAROSE EM AMOSTRAS DE XANTANA RECUPERADA COM ETANOL	63
TABELA 9 - ESTATISTICA DESCRITIVA DOS VALORES PERCENTUAIS (P/P) DE SACAROSE NA	
XANTANA BRUTA	64
TABELA 10 - CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA MÁXIMA OBTIDA EM CADA UM DOS CINCO	
ENSAIOS	68
TABELA 11 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTE T DE STUDENT PARA O MODELO Y=A.ABS+B	72
TABELA 12 - DADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 3	75
TABELA 13 - MODELOS PROPOSTOS PARA AJUSTE DOS DADOS DO ENSAIO 3	76
TABELA 14 - PARÂMETROS DOS MODELOS PROPOSTOS PARA AJUSTE DOS DADOS DO ENSAIO 3	76
TABELA 15 - DADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 5	80
TABELA 16 - MODELOS PROPOSTOS PARA AJUSTE DOS DADOS DO ENSAIO 5	81
TABELA 17 - PARÂMETROS DOS MODELOS PROPOSTOS PARA AJUSTE DOS DADOS DO ENSAIO 5	81
TABELA 18 - DADOS DA ANÁLISE REOLÓGICA DA SOLUÇÃO DE XANTANA DE GRAU	
ALIMENTÍCIO CPKELCO	84
TABELA 19 - DADOS DA ANÁLISE REOLÓGICA DA SOLUÇÃO DE XANTANA DE GRAU	
INDUSTRIAL CPKELCO	84
TABELA 20 - RESULTADO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (NRRL B-1459*)	97
TABELA 21 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES OBTIDOS PARA A RESPOSTA	
CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H (NRRL B-1459*)	99
TABELA 22 - ANOVA - MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO (NRRL B-1459*)	101
TABELA 23 - ANOVA - MODELO DE 4 PARÂMETROS PARA A RESPOSTA RENDIMENTO (NRRL B-	
1459*)	102
TABELA 24 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES OBTIDOS PARA A RESPOSTA	
RENDIMENTO (NRRL B-1459*)	105
TABELA 25 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA (NRRL B-	
1459*)	106
TABELA 26 – PARÂMETROS DA CURVA DE DESEJABILIDADE PARA CADA RESPOSTA (NRRL B-	
1459*)	108
TABELA 27 - RESULTADO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA LINHAGEM ATCC 13951	110
TABELA 28 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H	
(ATCC 13951)	111

TABELA 29 - ANOVA - MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO (ATCC 55298)	113
TABELA 30 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DE RENDIMENTO (ATCC 13951)	115
TABELA 31 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DE K (ATCC 13951)	116
TABELA 32 – PARÂMETROS DA CURVA DE DESEJABILIDADE PARA CADA RESPOSTA (ATCC	
13951)	117
TABELA 33 – TESTE T PARA MÉDIAS POPULACIONAIS INDEPENDENTES	119
TABELA 34 - RESULTADO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA LINHAGEM ATCC 55298	121
TABELA 35 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H	
(ATCC 55298)	122
TABELA 36 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DA RESPOSTA RENDIMENTO (ATCC 55298)	126
TABELA 37 - ANOVA DO MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA K (ATCC 55298)	127
TABELA 38 - ANOVA DO MODELO DE 8 PARÂMETROS PARA A VARIÁVEL K (ATCC 55298)	128
TABELA 39 – PARÂMETROS DA CURVA DE DESEJABILIDADE PARA CADA RESPOSTA (ATCC	
55298)	131
TABELA 40 – RESUMO DAS RESPOSTAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO COM CADA	
LINHAGEM	134
TABELA 41 - RESUMO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE OPERAÇÃO PARA MAXIMIZAÇÃO DAS	
RESPOSTAS	134
TABELA 42 – COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO E NOS	
ENSAIOS DE VALIDAÇÃO (ATCC 13951)	147
TABELA 43 – COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO E NOS	
ENSAIOS DE VALIDAÇÃO (ATCC 55298)	155
TABELA 44 – DADOS DAS BATELADAS 01/01 A 02/02	156
TABELA 45 - DADOS DAS BATELADAS 01/03 A 02/03	157

1 Introdução

A xantana é um polissacarídeo produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* e tem muitas aplicações na indústria de alimentos como espessante de soluções aquosas e estabilizante de suspensões e emulsões. A xantana é utilizada em muitos alimentos como sucos, bebidas, sorvetes, molhos, sopas, preparações em pó para sobremesas. A maior parte da xantana produzida no mundo, entretanto, é destinada ao uso na recuperação de petróleo, tintas, explosivos, graxas e cosméticos.

A molécula da xantana é uma cadeia polimérica que consiste de uma cadeia principal formada por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas β -(1,4), similar à cadeia da celulose, substituída alternativamente por uma ramificação constituída de α -manose, ácido β -glucurônico e β -manose. O terminal D-manosil e o D-manosil não terminal, ligado à cadeia principal, estão acetilados e piruvilados em diferentes graus dependendo das condições de cultivo e da linhagem produtora conferindo caráter aniônico à molécula. Esta complexa estrutura confere à xantana seu poder viscosificante quando dissolvido em água. A conformação da xantana em soluções salinas pode ser de fita simples ou de dupla hélice a depender da linhagem produtora, processo de recuperação e o grau de substituição por acetato e piruvato das unidades de manose.

Tipicamente, a *Xanthomonas campestris* é cultivada em reatores com boa agitação e aeração. O meio de cultivo contém uma fonte de carboidrato, geralmente glicose ou sacarose, uma fonte de nitrogênio e sais minerais. Ao final da fermentação, o caldo fermentado é diluído e centrifugado para eliminação das células, no caso de produção de xantana de grau alimentício, ou é submetido a tratamento térmico para inativação das células bacterianas, no caso de produção de xantana grau industrial. A goma é em seguida recuperada do caldo por precipitação com isopropanol ou etanol. Finalmente, o polímero é secado, moído e empacotado.

Comercialmente, a xantana é produzida por processo convencional de batelada simples utilizando reatores de mistura. O processo é altamente aeróbio e dura cerca de 100 horas com temperatura na faixa de 28°C a 30°C, pH 7, aeração maior que 0,3 vvm e potência de agitação maior que 1kW/m³. Um rendimento próximo de 50% é típico deste processo. Dentre a maioria dos trabalhos publicados sobre produção de xantana utilizando diferentes desenhos de reatores e vários modos de operação, o uso de reatores de mistura

em processo de batelada simples é o processo mais comumente empregado. Processos de produção de xantana por batelada alimentada ou processo contínuo também foram estudados, entretanto, não há relatos de estudos sobre o processo de xantana por meio de bateladas repetidas em reator de coluna de bolha

O uso de reatores de mistura tem o inconveniente de desenvolver zonas de estagnação distantes dos agitadores, particularmente próximo às paredes e qualquer outro objeto submerso como chicanas e sondas. Nestas zonas de estagnação, ocorrem condições subótimas de pH e oxigênio dissolvido o que leva a redução na taxa de produção de xantana. Em contraste com os reatores de mistura, os reatores de coluna de bolha exibem excelente performance de mistura mesmo a altas concentrações de xantana quando prevalece o escoamento pistonado vertical (*plug flow*) além de uma alta taxa de transferência de oxigênio.

Por outro lado, nas operações em batelada ou batelada alimentada, um ciclo completo de etapas operacionais, incluindo esterilização das linhas, do reator e do mosto, fermentação (reação), esvaziamento e limpeza do reator, é necessário para retornar o sistema ao ponto inicial pronto para uma nova batelada. Operações em batelada também requerem um novo inóculo a cada batelada. Em face de toda esta complexidade da operação em batelada de processos fermentativos que requerem operação em ambiente totalmente estéril, a operação por bateladas repetidas oferece vantagens, eliminando a necessidade de um novo inóculo a cada batelada e todo um ciclo de preparo do sistema operacional. No processo por bateladas repetidas, parte do caldo fermentado da batelada finalizada é deixada no reator que é, em seguida, alimentado com mosto estéril para iniciar uma nova batelada. Este procedimento permite um uso mais eficiente do fermentador e aumento da produtividade.

O processo por bateladas repetidas associado ao uso de um reator tipo coluna de bolha, portanto, apresenta-se como uma ótima alternativa para a produção de xantana face às vantagens de redução de custos operacionais e aumento de produtividade. O presente trabalho, portanto, teve como propósito avaliar a performance da associação do uso do reator tipo coluna de bolha com o processo de bateladas repetidas na produção de xantana.

Cabe relatar, nesta seção, um breve histórico deste projeto que foi inicialmente idealizado pelo presidente da Açucareira Corona S/A que queria investir na produção de

goma xantana. Para o desenvolvimento deste projeto, foi formada uma equipe envolvendo o laboratório de Biotecnologia e processos do CPQBA/UNICAMP representados por mim, Érika Durão Vieira, engenheira química, e o meu orientador, Silvio Roberto Andrietta, o engenheiro de alimentos e consultor Guiraldini, e dois funcionários da Açucareira Corona, o engenheiro químico Rogério e o biólogo João Antônio Prudenciatti. A concepção do processo por bateladas repetidas utilizando um reator de coluna de bolha surgiu da necessidade em se reduzir custos de produção com base nas vantagens supracitadas.

Os ensaios foram realizados tanto em escala de laboratório no CPQBA/UNICAMP quanto em escala piloto, dentro das dependências da usina Bonfim pertencente àquela época à Açucareira Corona. Dentro deste contexto, tendo como principal objetivo a avaliação do processo de bateladas repetidas na produção da goma xantana, outras etapas do processo de produção foram avaliadas na medida em que problemas operacionais, tanto em escala de laboratório quanto em escala piloto, iam surgindo. Este trabalho, portanto, foi o resultado de uma parceria entre a UNICAMP e a Açucareira Corona S/A, que, atualmente, não existe mais como pessoa jurídica.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de produção de goma xantana em reator de coluna de bolha utilizando processo de batelada repetida bem como otimizar as condições de produção e de recuperação da goma. Foram utilizadas neste estudo duas linhagens da bactéria *Xanthomonas campestris*: ATCC 13951 e ATCC 55298. A otimização da produção de xantana foi baseada em planejamento fatorial de 3 fatores em configuração estrela com repetição no ponto central. Os efeitos estudados foram a concentração inicial de sacarose, a temperatura e a vazão de ar e três respostas analisadas foram concentração final de xantana, rendimento em xantana e o parâmetro reológico índice de consistência.

3 Revisão Bibliográfica

O interesse em polissacarídeos microbianos extracelulares iniciou nos anos 50 quando um programa de pesquisa do Northern Regional Research Center of the Agricultural Research Service desenvolveu com sucesso um processo fermentativo e enzimático para a produção de dextrana, um polissacarídeo útil para o uso clínico como expansor do plasma sanguíneo (Slodki and Cadmus, 1978). Paralelamente, muitos estudos de microrganismos fitopatogênicos que excretavam polissacarídeos para o meio externo foram realizados a fim de investigar a possibilidade de produção em larga escala destes biopolímeros (Lilly *et al.*, 1957).

Uma revisão sobre os aspectos relacionados à agitação, transferência de massa e escalonamento de processos fermentativos envolvendo a produção de polissacarídeos apresentada por Margaritis and Zajic (1978) enfatizou a importância crescente dos polissacarídeos extracelulares na indústria de alimentos como estabilizantes, espessantes e emulsificantes. Wells (1977) apontou as vantagens do uso polissacarídeos microbianos incluindo a possibilidade fornecimento regular em contraste com a sazonalidade da oferta dos polissacarídeos de origem vegetal e melhores características funcionais.

Lilly *et al.* (1957) publicaram o primeiro trabalho sobre a produção em escala de laboratório do polissacarídeo produzido por bactérias da espécie *Xanthomonas* incluindo a *X. phaseoli, X. campestris, A. malvasearum* entre outras. Moraine and Rogovin (1966) citaram diversos trabalhos publicados por pesquisadores do Northern Regional Research Laboratory (NRRL) que descreviam a produção de gomas ou polissacarídeos solúveis em água, incluindo o polissacarídeo produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, a goma xantana, que, àquela época, já estava sendo produzida industrialmente.

3.1 Xantana

3.1.1 Microrganismo produtor

Xanthomonas é um gênero da família *Pseudomonaceae* e todos os organismos deste gênero são fitopatogênicos. A bactéria *Xanthomonas* é causadora da doença de Podridão Negra em culturas vegetais economicamente importantes como o repolho, a couve-flor e a couve-manteiga (Souza *et al.*, 2003). Espécies de *Xanthomonas* sp. também foram apontadas como causadora da falsa estria vermelha na cana-de-açúcar (Mantovani,

2006; Blanch, 2008). A virulência do gênero *Xanthomonas* está parcialmente relacionada a danos no sistema vascular provocados pelo bloqueio do suprimento de nutrientes causado pela formação do polissacarídeo (Sutton and Williams, 1970, *apud* Nitschke e Rodrigues, 2000). A virulência, entretanto, não pode ser considerada um parâmetro satisfatório na seleção de potenciais linhagens produtoras de xantana apresentando alta produtividade e alta qualidade da goma (Nitschke e Rodrigues, 2000).

As células de *Xanthomonas* são bastonetes de pigmentação amarela, Gramnegativos, quimiorganotróficos e estritamente aeróbios. As células apresentam dimensões de 0,4-0,7 µm de largura e 0,7-1,8 µm de comprimento (García-Ochoa *et al.*, 2000). A ausência de pigmentação pode ocorrer devido à degradação da linhagem por causa de repiques sucessivos e manutenção inadequada (Kidby *et al.*, 1977)

A manutenção das características genéticas de uma cultura depende fortemente do método utilizado e de reativações periódicas em meio de cultivo adequado. De maneira geral, alterações genéticas ou mutações espontâneas ocorrem ao acaso em todas as regiões do gene (Luria and Delbrück, 1973, *apud* Kidby *et al.*, 1977). Entretanto, estas mutações não costumam ocorrer em regiões codificadoras críticas ou então envolvem a substituição de um aminoácido similar ao anterior na codificação de uma proteína não afetando a sua funcionalidade. Assim sendo, as mutações espontâneas não costumam impactar fortemente no fenótipo do microrganismo.

A taxa de mutação é uma função das taxas de reparo, replicação e translação ou de condições físicas de exposição do microrganismo como temperatura, baixa atividade de água, formação de cristais de gelo. A forma de preservação, portanto, deve minimizar danos celulares e, conseqüentemente, diminuir a formação de mutantes que possam vir a refletir em alterações na produtividade, qualidade do produto de interesse e características básicas da cultura original. Por outro lado, a exploração industrial de um microrganismo na produção de um produto de interesse envolve a propagação de inóculo para grandes fermentadores de modo que existe a possibilidade de ocorrer alterações na cultura devido á alta taxa de replicação (Kidby *et al.*, 1977).

Adicionalmente, estudos relacionados à adaptação de bactérias sugerem que estas podem regular a geração de mutantes em sítios específicos como resposta às condições adversas do meio externo. A exposição contínua a mudanças de ambiente ou a ambientes estressantes pode indiretamente impor uma seleção de mecanismos ou rotas metabólicas que geram variações fenotípicas a fim de aumentar a probabilidade de sobrevivência da bactéria. Estas variações podem ocorrer tanto por regulação diferencial da expressão gênica quanto por mutação genética (Massey and Buckling, 2002).

A instabilidade da linhagem *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 na conservação em agar inclinado por longos períodos (12 a 18 meses) foi relatada por Cadmus *et al.* (1976). O aspecto das colônias formadas em YMA quando a linhagem sofre degradação muda de cor e tamanho. As colônias íntegras, denominadas de colônias grandes, apresentam-se em amarelo brilhante e diâmetro de 4-5 mm enquanto que as colônias degradadas, denominadas colônias pequenas, apresentam-se na cor amarelo opaco e diâmetro de 2 mm. O rendimento em xantana após degradação cai de 62% para 43% e a quantidade de ácido pirúvico também diminui tornando a qualidade da goma produzida inferior (Sandford, 1977). Kidby *et al.* (1977) recomendaram o uso de técnicas de longo prazo para manutenção das características da *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459.

Galindo *et al.* (1994) realizaram um estudo de estabilidade da linhagem NRRL B-1459 e de uma linhagem variante E2 derivada desta na preservação em agar inclinado com repiques mensais por um período de 11 meses. A instabilidade das linhagens na preservação em agar inclinado, entretanto, não foi observada embora alguma variabilidade tenha sido verificada na produção específica de xantana (massa de xantana (g)/massa de células(g)) e no índice de viscosidade ($\ln(\eta_{ap})(cp)/concentração de xantana(g/L)$) que foi atribuída mais à cinética da fermentação do que à instabilidade da linhagem.

Martinez-Salazar *et al.* (1993), utilizando técnicas de biologia molecular, verificaram que o genoma da linhagem *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 é tão estável quanto o de qualquer outra bactéria Gram-negativa. Entretanto, Kamon e Kado (1990) relataram que algumas linhagens variantes da NRRL B1459 adquiriram deficiência na produção de goma e mobilidade associada à quimiotaxia, quando deixadas por longo tempo incubadas em placas de agar 0,2% numa condição em que os nutrientes se esgotam e o meio semi-sólido permite a mobilidade em busca de nutrientes. Martinez-Salazar *et al.* (1993) também estudaram a quimiotaxia da *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 e de suas variantes com motilidade e resposta quimiotáxica e sugeriram que este evento não é decorrente de um rearranjo genético mas sim regulação gênica.

Cadmus *et al.* (1976), entretanto, não relataram que as linhagens degradadas apresentavam mobilidade mas somente menor produção de goma e menor qualidade da goma bem como colônias de tamanho menor e amarelo opaco. Martinez-Salazar *et al.* (1993) relataram que bactérias Gram-negativas não *Xanthomonas* sp. formadoras de colônias pequenas (mutante *petit*) eram freqüentemente encontradas em associação com as *Xanthomonas* sp. e sugeriram que estas colônias seriam aquela relatadas por Cadmus *et al.* (1976). O fenômeno de degradação da linhagem observado por Cadmus *et al.* (1976), portanto, não está totalmente elucidado e, diante do exposto, estas variabilidades devem ter sua origem na regulação diferencial da expressão gênica (Massey e Buckling, 2002).

3.1.2 Estrutura e Propriedades

A estrutura química da molécula da xantana foi investigada por Lindberg *et al.* (1975) *apud* Milas and Rinaudo (1979). A xantana é um heteropolissacarídeo que consiste de uma cadeia principal formada por resíduos β -(1-4)-D-glicose, similar à cadeia da celulose, substituída por cadeias laterais de um trissacarídeo constituído de duas moléculas de manose e uma de ácido glucurônico. Estas cadeias laterais ou ramificações estão ligadas por meio de um dos resíduos de manose à cadeia principal na posição O-3. O ácido glucurônico encontra-se entre os dois resíduos de manose. O resíduo de manose ligado à cadeia principal pode estar substituído na posição O-6 por um grupamento acetato e o resíduo de manose terminal pode estar substituído na posição O-4 e O-6 por um resíduo de ácido pirúvico conforme mostrado na Figura 1.



FIGURA 1 – ESTRUTURA DA MOLÉCULA DA XANTANA (GARCIA-OCHOA ET AL., 2000)

Em geral, aproximadamente, 50% dos resíduos terminais encontram-se substituídos, enquanto que a proporção de substituição do resíduo de manose ligada à cadeia principal pelo grupamento acetil é bastante variável dependendo da espécie e linhagem da bactéria *Xanthomonas* e das condições de cultivo (Garcia-Ochoa *et al.*, 2000, Peters *et al.*, 1993). Estes resíduos carboxilados da cadeia lateral conferem à molécula de xantana carga negativa caracterizando-a como um polieletrólico, ou melhor, um poliânion quando dissolvido em água (Pasika, 1977). A massa molecular média das moléculas de xantana nativa é da ordem de 10^6 Daltons e depende fortemente das condições de cultivo (Holzwarth, 1977) estando também fortemente associada à taxa de crescimento específica (Peters *et al.*, 1993).

A estrutura molecular da xantana quando dissolvida em água confere às soluções aquosas propriedades não usuais e muito distintas de outros polissacarídeos: habilidade de estabilizar emulsões e suspensões, alta dependência da viscosidade com a taxa de cisalhamento (alta pseudoplasticidade), pouca variação da viscosidade com a temperatura em condições de utilização industrial e alta tolerância ao sal (Morris, 1977). Estas características, somada a não sazonalidade da demanda, são responsáveis pelo extenso uso desta goma microbiana até os dias de hoje, especialmente, na indústria de alimentos (Furtado, 2004) e na indústria do petróleo (Sandvik and Maerker, 1977, Kilicke, 1990).

3.1.3 Biossíntese

O genoma de algumas linhagens de *Xanthomonas* sp. foi seqüenciado e os genes codificadores das enzimas envolvidas na produção da goma foram identificados bem como os genes codificadores das enzimas envolvidas nos caminhos metabólicos de carboidratos foram encontrados para toda a via glicolítica e para a glucogênese incluindo a glicólise, a via de Entner-Doudoroff e a via pentose-fosfato resultando na síntese do piruvato para ser utilizado no ciclo do ácido cítrico (Vorhölter *et al.*, 2008).

As proteínas envolvidas na síntese da xantana são codificada pelos genes *gumBCDEFGHIJKLM* que estão localizados em um único cluster de 12 kb expressos por meio de um único operon a partir de um promotor próximo do primeiro gene, *gumB*. Vorhölter *et al.* (2008) propuseram um modelo mecanístico para a síntese da molécula de xantana baseando-se no seqüenciamento do genoma da linhagem *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B-100 e na identificação dos genes codificadores do sistema enzimático

sintetizador da xantana comparando-os a dados disponíveis na literatura referentes as proteínas envolvidas na síntese de exopolissacarídeos microbianos e outros seqüenciamentos do genoma de *Xanthomonas* sp.

Segundo o modelo proposto, a síntese da xantana ocorre na parte interna da membrana celular, onde o pentassacarídeo glicose-glicose-manose-glucuronato-manose é formado pela ação de glicosiltransferases codificadas pelos genes D, M, H, K e I. Os monossacarídeos estão disponíveis na forma gliconucleotídeos ligado a lipídeos carreadores ligados à membrana. As unidades de manose são acetiladas e piruviladas por enzimas codificadas pelos genes *gumF*, *gumG* e *gumL*. As unidades monoméricas são exportadas para o meio periplasmático pela enzima codificada pelo gene *gumJ* e polimerizadas pela enzima *gumE* para formar a molécula de xantana que é em seguida transportada para o meio externo pela proteína codificada pelo gene *gumB*. Este modelo, no entanto, necessita ser validado por dados experimentais, particularmente no que diz respeito ao sistema enzimático de polimerização e transporte do polissacarídeo. A Figura 2 mostra o esquema do modelo proposto por Vorhölter *et al.* (2008).



FIGURA 2 – MODELO MECANÍSTICO PARA A SINTESE DA XANTANA PROPOSTO POR VORHÖLTER *ET AL.* (2008)

3.1.4 Reologia

A reologia é a ciência que estuda escoamento da matéria e a classifica entre dois extremos: sólido ideal (comportamento puramente elástico) ou líquido ideal (comportamento puramente viscoso). Os fluidos reais apresentam tanto características viscosas quanto elásticas, em maior ou menor grau dependendo da velocidade de observação. Os fluidos reais são, portanto, viscoelásticos (Steffe, 1996)

Para alguns fluidos, pode-se desconsiderar o componente elástico devido a sua baixa magnitude e pouca influência no comportamento reológico nas condições típicas de trabalho (Steffe, 1996). Os tipos de escoamentos puramente viscosos são classificados pela relação entre a taxa de cisalhamento aplicada ao fluido ($\dot{\gamma}$) e a tensão (τ) gerada pela resistência ao movimento (Machado, 2002). A razão entre a tensão e a taxa de cisalhamento é chamada viscosidade (η) de um fluido: $\eta = \tau/\dot{\gamma}$. Quando a tensão varia linearmente com a taxa de cisalhamento, a viscosidade assume um valor constante independentemente da taxa de cisalhamento aplicada e o fluido é classificado como Newtoniano.

A maioria dos fluidos típicos da indústria de alimentos e do petróleo, entretanto, não apresenta esta relação linear entre $\dot{\gamma}$ e τ (Steffe, 1996; Machado, 2002). Estes fluidos, em geral, são soluções de uma mistura de compostos que consistem de macromoléculas dotadas de estruturas tridimensionais complexas cuja conformação varia de acordo com o solvente utilizado, polaridade ou força iônica do sistema, concentração, temperatura, etc. As interações intermoleculares e intramoleculares são responsáveis pelo comportamento reológico diverso destes fluidos. As curvas de fluxo típicas do comportamento puramente viscoso newtoniano e não-newtoniano que caracterizam as relações de dependência da tensão com a taxa de cisalhamento $\tau = f(\dot{\gamma})$ estão apresentadas na Figura 3.



FIGURA 3 – CURVAS DE FLUXO TÍPICAS DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO PURAMENTE VISCOSO (ADAPTADO DE STEFF, 1996)

Como pode ser observado na Figura 3, a relação $\tau = f(\dot{\gamma})$ depende da taxa de cisalhamento aplicada $\dot{\gamma}$ e também pode ser representada por uma curva. A viscosidade pontual, *i.e.*, relativa a um valor específico de taxa de cisalhamento é chamada de viscosidade aparente (η_{ap}) (Steffe, 1996). A Figura 4 apresenta a curva de viscosidade $\eta = f(\dot{\gamma})$ para cada tipo de comportamento reológico.



FIGURA 4 - CURVAS DE VISCOSIDADE TÍPICAS DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO PURAMENTE VISCOSO (ADAPTADO DE STEFFE, 1996)

Os fluidos peseudoplásticos (*Shear-Thinning*) caracterizam-se por uma redução da tensão e da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento, *i.e.*, a viscosidade diminui quanto maior é a velocidade de movimento do fluido. Em contraste, os fluidos dilatantes (*Shear-Thickening*) têm sua viscosidade aparente aumentada na medida em que entram em movimento. Os fluidos de Bingham e Herschel-Bulkley apresentam uma tensão limite de escoamento τ_0 (*yield stress*) para iniciar o movimento e, após vencida esta tensão limite, o primeiro comporta-se como um fluido newtoniano e o segundo como fluido peseudoplástico (Steffe, 1996). A relação matemática mais simples para representar a curva de fluxo é a equação da lei da potência:

$$\boldsymbol{\tau} = \boldsymbol{k} \cdot \dot{\boldsymbol{\gamma}}^n + \boldsymbol{\tau}_0 \qquad \qquad \text{EQUAÇÃO 1}$$

Na Equação 1, o parâmetro *n* é chamado de índice de comportamento de fluxo, pois seu valor vai determinar o tipo de comportamento reológico do fluido, e o parâmetro *k* é chamado de índice de consistência, pois seu valor vai determinar a magnitude da viscosidade aparente. A Tabela 1, adaptada de Steffe (1996), mostra os valores de *k*, *n* e τ_0 característicos para cada tipo de fluido.

Fluido	k	n	$ au_0$
Newtoniano	> 0	= 1	= 0
Pseudoplástivo	> 0	< 1	= 0
Dilatante	> 0	> 1	= 0
Bingham	> 0	= 1	> 0
Herschel-Bulkley	> 0	< 1	> 0

TABELA 1 – VALORES DE K, N E τ_0 para cada tipo de fluido

As curvas de viscosidade de fluidos pseudoplásticos apresentam duas regiões características de alta (η_0) e baixa (η_∞) viscosidades em que a relação $\tau = f(\dot{\gamma})$ é linear, *i.e.*, o fluido tem comportamento newtoniano. A Figura 5 mostra a curva de fluxo de um fluido pseudoplástico e as regiões newtonianas.



FIGURA 5 - CURVA DE FLUXO DE UM FLUIDO PSEUDOPLÁSTICO EVIDENCIANDO AS REGIÕES NEWTONIANAS DE ALTA E BAIXA VISCOSIDADE (ADAPTADO DE STEFFE 1996)

Na região de baixas taxas de cisalhamento, o movimento das moléculas é governado pelo movimento browniano, *i.e.*, a movimentação das moléculas ocorre ao acaso independentemente de efeitos inerciais de orientação (Machado, 2002). Na medida em que o fluido inicia o movimento, as moléculas passam a sofrer ação de forças externas e tendem a se movimentar na direção do fluxo, *i.e.*, as forças de cisalhamento superam as forças do movimento browniano. Esta é a região mediana em que a lei da potência expressa pela Equação 1 é válida e o log(τ) varia linearmente com log($\dot{\gamma}$). Segundo Machado (2002), na região de altas taxas de cisalhamento, "o estado de quase perfeita orientação das moléculas já foi alcançado e o fluido tende assintoticamente a um valor de viscosidade constante e definido novamente".

As soluções aquosas de gomas microbianas foram bastante estudadas e a maioria destes polissacarídeos microbianos apresentam comportamento pseudoplástico, inclusive as soluções de xantana (Elliot, 1977). Na região de baixas taxas de cisalhamento, a viscosidade newtoniana η_0 é influenciada principalmente pelo peso molecular e concentração do polímero (Milas, 1985; Elliot, 1977).

3.1.4.1 Origem molecular das propriedades reologias das soluções de xantana

Morris (1977) descreve as propriedades não usuais da xantana correlacionando-as à sua estrutura. Segundo Morris, em geral, moléculas de polieletrólitos adotam uma conformação altamente expandida sob condições da baixa força iônica, mas colapsam para uma conformação mais compacta com a adição de sal, devido à blindagem da carga. O efeito deste colapso traduz-se macroscopicamente por uma redução da viscosidade de soluções de polieletrólitos quando submetidos a uma alta força iônica.

As soluções de xantana, entretanto, não apresentam este efeito de redução de viscosidade com o aumento da força iônica, indicando a manutenção da conformação de um bastão rígido, típico de moléculas de celulose em que forças intramoleculares impedem a mobilidade das moléculas. A Figura 6 mostra os dois tipos extremos de conformação molecular de polissacarídeos: o bastão rígido ou fita estendida e o novelo aleatório ou fita flexível.



FIGURA 6 – ILUSTRAÇÃO DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS (1,6) E (1,4) COM INDICAÇÃO DAS POSSÍVEIS ROTAÇÕES INTRAMOLECULARES E DAS CONFORMAÇÕES EM FITA FLEXÍVEL E FITA ESTENDIDA

Quando as ligações entre os resíduos não são diagonalmente opostas (ligação 1,3) ou paralelas (ligação 1,4, axial-equatorial), ocorre uma sistemática torção na direção da cadeia, levando a novelos mais compactos. Neste caso, a estrutura adotada no estado sólido tende a ser de hélices que se empacotam coaxialmente para maior estabilidade (dupla hélice ou tripla hélice). Em polissacarídeos com ligações glicosídicas (1,6), como as dextranas, os resíduos podem girar em torno de três (ao invés de duas) ligações covalentes que permitem considerável liberdade conformacional (Lapasin and Pricl, 1995).

No caso das moléculas de xantana, além dos efeitos das ligações β -(1,4)glicosídicas da cadeia principal, existe o efeito das ramificações polarizadas. Um estudo apresentado por Morris (1977) indicou, por meio de Ressonância Nuclear Magnética (RMN), relaxação, rotação óptica, dicroísmo circular e viscosidade intrínseca, que as moléculas de xantana apresentam uma ordenação da estrutura que é estabilizada com o aumento da força iônica suportando temperaturas de até 100°C. O autor sugeriu que o aumento da força iônica levava a uma melhor na disposição das cadeias laterais ao longo da cadeia principal. Moorhouse *et al.* (1977) apresentaram o primeiro estudo sobre a conformação molecular da xantana utilizando difração de raio-X e modelagem molecular. Os autores concluíram que a conformação helicoidal 5/1 de 4,7 nm de comprimento era a mais provável por apresentar a melhor estabilização das cadeias laterais ao longo da cadeia principal apesar de o espectro de raio-X indicar a existência zonas amorfas na molécula.

Milas e Rinaudo (1979) confirmaram que a estabilização intramolecular, resultante da formação de pontes de hidrogênio entre cadeias laterais proposta por Moorhouse, é responsável pela manutenção da viscosidade das soluções de xantana a altas temperaturas e alta força iônica. Tako (1992) estudou o efeito da despiruvilação e desacetilação das cadeias laterais das moléculas de xantana e mostrou que os dois grupamentos em conjunto são responsáveis pela estabilização da estrutura, apesar de o grupamento acetil da manose ligada a cadeia principal ter menor influência. Diaz *et al.* (2004) apresentaram um revisão sobre a reologia de soluções aquosas de xantana incluindo os aspectos da estrutura química e dos efeitos da adição de eletrólitos.

3.1.4.2 Reologia de soluções aquosas de xantana

Xuewu et al. (1996) estudaram da reologia de soluções aquosas de xantana e propuseram vários modelos para a viscosidade em função da taxa de cisalhamento

temperatura e concentração utilizando um viscosímetro da Brookfield. A julgar pelos procedimentos experimentais, as soluções foram preparadas com água destilada sem adição de sal. A dependência da viscosidade com a taxa de cisalhamento ajustou-se bem ao modelo da lei da potência e os valores do índice de consistência *n* decresceram na medida em que a concentração aumentou (*n*=0,77 para C=0,3%, *n*=0,46 para C=0,5% e *n*=0,24 para C=0,7%, etc.).

Marcotte *et al.* (2001) estudaram as propriedades reológicas de soluções aquosas de hidrocolóides com concentração salina de 1% utilizando viscosímetro rotacional. Os autores determinaram os parâmetros reológicos de soluções aquosas de xantana baseado no modelo de Herschel-Bulkley, considerando, portanto, a existência de uma tensão limite de escoamento (τ_0). Os valores dos parâmetros foram obtidos para soluções de xantana a 2% e em diferentes temperaturas fazendo-se uma varredura da temperatura mais baixa para a mais alta (*Upward*) e, em seguida, da mais alta para a mais baixa (*Downward*). Os valores de k obtidos na varredura decrescente de temperatura (*Downward*) estão um pouco menores que os valores obtidos na varredura inicial crescente (*Upward*) indicando uma pequena perda na capacidade viscosificante. Os valores de *n* obtidos na varredura decrescente (*Downward*), entretanto, nas temperaturas de 40°C e 20°C foram um pouco menores que os obtidos na varredura inicial crescente (*Upward*) indicando uma pseudoplasticidade da solução.

Garcia-Ochoa *et al.* (1994) determinaram a tensão limite de escoamento (τ_0) de soluções aquosas de xantana em baixas concentrações (1, 1,5 e 2 g/L) preparadas em diferentes temperaturas (25, 40, 60 e 80°C). As soluções foram submetidas a análise viscosimétrica em diferentes temperaturas. O ajuste dos dados experimentais às curvas de escoamento pelo modelo de Casson resultou em diferentes valores de τ_0 em função da concentração do polímero, da temperatura de dissolução e da temperatura utilizada na determinação da curva de escoamento. O valor de τ_0 diminui com a diminuição da concentração de xantana e também diminui com o aumento da temperatura de determinação da curva. Este efeito é menos proeminente quando a temperatura de dissolução é maior e os autores atribuíram este efeito à mudança conformacional das moléculas de xantana com o aumento da temperatura que já havia sido relata da por outros pesquisadores e confirmaram esta mudança por dicroísmo circular. Cabe ressaltar que esta mudança conformacional, na

verdade, favorece a formação de redes moleculares conforme relatado por Iseki *et al.* (2001).

Parte das observações relatadas por Gracía-Ochoa *et al.* (1994) e Marcotte *et al.* (2001) referentes à tensão limite de escoamento e diminuição da capacidade viscosificante estão relacionadas à tixotropia e à formação de géis fracos característicos do comportamento reológico de soluções de xantana. A tixotropia é o fenômeno de redução da tensão de cisalhamento, ou viscosidade aparente, como o tempo quando aplicada uma taxa de cisalhamento constante. Este fenômeno está estreitamente associado a fluidos pseudoplásticos em que o cisalhamento provoca a ruptura da frágil estrutura tridimensional e orientação das moléculas no sentido do fluxo (Lapasin and Pricl, 1995; Machado 2002).

Redes tridimensionais intermoleculares ocorrem quando macromoléculas, como polissacarídeos e proteínas, associam-se por meio de zonas de junção tanto nas extremidades quanto nas regiões internas da cadeia polimérica. Esta forma mais ordenada das moléculas na solução aquosa confere características de gel – um estado intermediário entre um sólido e um líquido. Muitos são os tipos de interação entre as moléculas para que esta rede seja formada incluindo interações hidrofóbicas, hidrofílicas e até a participação de íons, como é o caso da formação de géis de alginato com adição de cálcio (Lapasin e Pricl, 1995). Dea e Morris (1977) relataram que a xantana forma géis quando soluções aquosas, sozinha ou em associação com galactomananas, agar e carragena. Os pesquisadores evidenciaram uma maior afinidade em formar redes moleculares com galactomananas sugerindo que esta sinergia poderia estar associada à virulência da *Xanthomonas* sp. uma vez que galactomananas são polissacarídeos de reserva vegetal (Katzbauer, 1998).

Iseki *et al.* (2001) estudaram a cinética de formação desta rede tridimensional em função da temperatura e do tempo de repouso. Em temperaturas mais elevadas e tempos maiores de repouso, há a formação de géis mais fortes devido ao maior emaranhamento das cadeias, *i.e.*, maior quantidade de zonas de junção intermoleculares.

Pai e Khan (2002) estudaram a reologia de misturas de goma xantana e goma guar modificada enzimaticamente para determinar o efeito de interação entre as moléculas na formação da rede tridimensional. Braga e Cunha (2004) estudaram géis de caseinatoxantana-sacarose devido a sua importância na indústria de derivados do leite em que a xantana serve como agente estabilizante na manutenção textura destes produtos.
3.1.5 Aplicações e mercado

Weels (1977) apresentou uma revisão do mercado de polissacarídeos microbianos ressaltando a elevada demanda de goma xantana no mercado mundial, especialmente, na indústria alimentícia e de petróleo. Quase vinte anos depois, o mercado de aditivos alimentares continuava aquecido e com boas projeções para o futuro uma vez que a demanda por produtos prontos e com baixos teores de gordura eram cada vez maior (Breskin e O'Conor, 1995). Furtado (2004) enfatizou que o desequilíbrio climático dos últimos anos tem provocado a escassez de gomas de origem vegetal incentivando o desenvolvimento de novas alternativas para aditivos alimentícios espessantes e gelificantes. A goma xantana ainda foi apontada como detentora de um mercado crescente na indústria de alimentos com uma demanda de 1.500 t/ano somente no Brasil, incluindo o mercado de petróleo.

Katzbauer (1998) apresentou uma revisão sobre as aplicações da goma xantana na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica e em outras áreas em que a estabilização de emulsões é importante. Antes de sua aprovação como ingrediente alimentício, a xantana foi extensivamente estudada relativamente à toxicologia e segurança. Em 1969, o FDA (EUA) aprovou o uso goma xantana como aditivo alimentício para uso como estabilizante e espessante (Fed.Reg. 34:5376) e, em 1980, o FSA (CE) inclui a goma xantana na lista de espessantes e estabilizantes de alimentos sob o código E415.

A goma xantana é, como muitas outras gomas industriais com exceção de produtos amiláceos, não-digerível para humanos servindo como um conteúdo não calorífico e acelerador do transito gastrointestinal. A pseudoplasticidade da goma xantana melhora as propriedades sensoriais de produtos alimentícios (liberação do sabor, textura e corpo) e a existência de uma tensão limite de escoamento e/ou formação de géis fracos garante a homogeneidade de suspensões e emulsões (Katzbauer, 1998).

Andrew (1977) relatou algumas das primeiras pesquisas envolvendo a aplicabilidade da goma xantana na indústria de alimentos. Dentre elas, citou o uso na preparação de queijos para melhorar a textura e na preparação de suplementos alimentares na forma liquida para diminuir a formação de precipitados minerais ou protéicos, servindo, portanto, como um agente de suspensão. Ma e Barbosa-Cánovas (1995) estudaram a reologia de formulações de maionese contendo goma xantana. Fryer *et al.* (1996) usou a

goma xantana para formular xaropes de frutose de milho com reduzido teor de calorias. Shimada *et al.* (1996) estudaram a habilidade da goma xantana em quelar metais em uma emulsão óleo/água contento óleo de soja e ciclodextrina e evidenciaram a diminuição do consumo de oxigênio dissolvido pelo Fe^{2+} quando à emulsão era adicionada xantana 0,1%. Braga e Cunha (2004) estudaram a reologia de formulações típicas de produtos lácteos contendo caseína, goma xantana e sacarose. Guarda *et al.* (2004) avaliaram o uso de xantana e outros hidrocolóides na formulação de pães e evidenciou a sua capacidade de retenção da umidade. Fernández *et al.*(2008) avaliaram o uso de hidrocolóides em massa batata congelada e a xantana mostrou ser promissora na manutenção das características sensoriais do produto. Estes estudos mostram a importância que esta goma ainda tem como aditivo na indústria de alimentos mesmo 40 anos após a sua introdução neste mercado.

Paralelamente, o uso da goma xantana na indústria do petróleo também foi ganhando cada vez mais importância. Sandivik e Maerker (1977) relataram a aplicabilidade da goma xantana na recuperação primária e secundária do petróleo. Soluções aquosas de xantana em concentrações baixas têm a capacidade de reduzir a mobilidade da água nos poros das rochas aumentando, assim, o deslocamento do óleo e, conseqüentemente, a sua recuperação. Apesar da sua superioridade quanto à manutenção da viscosidade mesmo em altas temperaturas, alta pressão, variações de pH e alta salinidade, condições típicas de operação nos processos de recuperação do petróleo, o uso da goma xantana causava o entupimento e perda de injetividade (ou permeabilidade) dos poços. Os pesquisadores atribuíram este problema à presença de restos celulares, que correspondiam a aproximadamente a 11% do peso da xantana, e também à formação de aglomerados moleculares. De fato, Rogovin *et al.* (1965) relatou a produção de xantana para uso industrial na qual as células não eram separadas do fermentado resultando num produto com menor grau de pureza e, portanto, menor custo.

Kulicke *et al.* (1990) relataram o crescente interesse do uso da goma xantana na recuperação avançada de petróleo (*enhanced oil recovery* ou, abreviadamente, EOR) devido às vantagens supracitadas. Os pesquisadores avaliaram diferentes amostras de goma xantana comercial e outras amostras produzidas em laboratório quanto à viscosidade e injetabilidade de suas soluções aquosas, características físico-químicas – conteúdo de acetato e piruvato e massa molecular – e pureza – presença de restos celulares. Eles foram motivados pelo relato de um estudo de campo feito no norte da Alemanha em que foram

observadas diferenças significativas de viscosidade e injetabilidade entre amostras de goma xantana comercial, incluindo lotes diferentes do mesmo fornecedor.

Kulicke *et al.* (1990) concluíram que a formação de agregados moleculares eram os causadores da baixa viscosidade e da baixa injetabilidade das amostras e que, embora a quantidade de restos celulares fosse grande, este fator não influenciava na injetabilidade das soluções de xantana. A formação de agregados foi estudada a luz da estrutura molecular das moléculas de xantana, caracterizada pela quantidade de piruvato de acetato, confrontada com medidas da viscosidade intrínseca e determinação da constante de Huggins (k_H), que é uma medida da interação intermolecular. Valores altos de k_H indicam alta interação molecular e, portanto, a existência de agregados. A filtração de soluções de xantana com alto k_H resultaram numa redução significativa em k_H indicando a presença de agregados moleculares na amostra. A relação entre a formação de agregados e a quantidade de acetato e piruvato, entretanto, não foi evidenciada.

Moreira (2002) relatou que o fator de recuperação do petróleo no Brasil é em torno de 20-25% significando que cerca de 80-85% do petróleo permanece no reservatório, aguardando que novas tecnologias de exploração sejam capazes de aumentar a eficiência dos meios de extração. A pesquisadora cita que, dentre os processos de recuperação de petróleo, a técnica de injeção de polímeros (*polymer flooding*) tem se mostrado como uma das mais promissoras, entretanto, a concepção destes processos ainda necessita de conhecimentos específicos sobre o efeito das diversas estruturas dos polimeros na otimização do deslocamento do petróleo. Segundo Bueno (2004), a recuperação avançada de petróleo também pode ser considerada como uma técnica que modifica características do meio, alterando as permeabilidades relativas ou viscosidades das fases e aumentando a recuperação de petróleo. A injeção de água contendo polímeros, por exemplo, reduz a mobilidade da fase aquosa, melhorando a eficiência do deslocamento.

3.2 Produção de xantana

Algumas boas revisões da literatura cobrindo todos os aspectos envolvidos na produção de goma xantana foram publicadas. Flores Candia e Deckwer (1999) abordaram aspectos de tecnologias de processamento incluindo os problemas de transferência de massa típicos de culturas de *Xanthomonas* altamente viscosas. García-Ochoa *et al.* (1999) apresentaram aspectos básicos e conceituais sobre a produção de xantana em escala de

laboratório incluindo os métodos de preparo do inóculo, esterilização do sistema, quantificação de biomassa e recuperação da xantana do fermentado. García-Ochoa *et al.* (2000) apresentaram uma revisão mais abrangente da literatura cobrindo igualmente os aspectos de produção, recuperação e propriedades da goma xantana. Rosalam e England (2006) investigaram a possibilidade de uso de fontes alternativas de carbono e outros nutrientes essenciais para a produção de goma xantana focando nos aspectos metabólicos e cinéticos da biossíntesse do polissacarídeo.

O primeiro relato na literatura referente à produção de goma xantana foi feito por Lilly *et al.* (1957). Os pesquisadores investigaram as necessidades nutricionais e condições de cultivo de várias *Xanthomonas* sp., dentre elas a *Xanthomonas campestris*, na produção de xantana em escala de laboratório utilizando um garrafão de 9 litros contendo 3 litros de meio. O meio utilizado era constituído de glicose, hidrolisado enzimático de caseína e alguns sais para suprimento de minerais e o pH ajustado em 6,0. O inóculo foi de 50 ml incubado por 48-72 horas a 25°C em mesa rotativa. A produção da goma no garrafão foi com aeração de 5 lpm (litro por minuto) por meio de um distribuidor de vidro sinterizado e a temperatura de 28°C por 5 dias (120h). O polissacarídeo foi recuperado por precipitação com acetona, filtrado a vácuo e secado em estufa a 55°C. Os pesquisadores relataram que a acetona retirou toda a pigmentação amarela sintetizada pela bactéria e que a formação de espuma era intensa havendo a necessidade do uso de anti-espumante.

Os resultados obtidos com a *Xanthomonas phaseoli* por Lilly *et al.* (1957). indicaram que: (i) a formação do polissacarídeo foi de 1,7/5,0/7,4/7,8/9,7 g/L em 1/2/3/4/5 dias de incubação respectivamente; (ii) maiores rendimentos foram obtidos a 33°C quando se variou a temperatura de 25 a 35°C; (iii) o maior rendimento (79%) foi obtido com concentração inicial de glicose em 10 g/L e a maior concentração de xantana (11,2 g/L) foi obtida com concentração inicial de glicose de 50 g/L a temperatura de 28°C; (iv) a glicose foi superior como fonte de carboidrato quando comparada com maltose, sacarose, amido solúvel e amido de milho em concentração de 10g/L; (v) o uso de alguns tipos de antiespumante, que foram adicionados juntamente com o meio em diferentes concentrações, reduziram o rendimento sendo mais conveniente adicioná-los quando da formação da espuma. Por outro lado, a incubação da espécie *Xanthomonas campestris* nas condições supracitadas rendeu 9,9 g/L de xantana e um rendimento de 39,6% tendo sido portanto apontada pelos pesquisadores como uma linhagem adequada para a produção de xantana em larga escala.

Atualmente, as etapas envolvidas na produção industrial de xantana não mudaram muito do relatado por Lilly *et al.* (1957) tendo sido melhoradas no que diz respeito a insumos e controle do processo levando a maiores rendimentos e produtividade. Segundo Flores Candia e Deckwer (1999), a produção industrial de goma xantana é feita por processo de batelada (100 h) utilizando a linhagem *Xanthomonas campestris* NRRL B1459 (equivalente a ATCC 13951) cultivada em reator de mistura nas seguintes condições: 28-30°C, pH controlado em 7,0, aeração maior que 0,3 vvm e potência gasta com agitação maior que 1 kW/m³. Rendimentos de 50% são típicos deste processo por batelada. O preparo do inóculo consiste de vários estágios requerendo um conjunto de reatores em que a cultura semente é cultivada em reator de 10 litros até se chegar aos fermentadores (100 m³). A Figura 7 mostra um fluxograma do processo de produção de goma xantana concebido por Flores Candia e Deckwer (1999).



FIGURA 7 – FLUXOGRAMA PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA CONCEBIDO POR FLORES CANDIA E Deckwer (1999)

O projeto de um processo de produção de xantana depende das demandas econômicas para se conseguir uma performance ótima relativamente à produtividade, concentração final do produto e rendimento bem como atender às especificações do produto relativas a sua aplicação. E esta não é uma tarefa trivial, pois, no processo de produção, a viscosidade aumenta drasticamente ocasionando variabilidade na qualidade do produto bem como reduzindo o rendimento (Flores Candia e Deckwer, 1999).

3.2.1 Requerimentos nutricionais

Moraine e Rogovin (1973) estudaram o efeito de fontes de nitrogênio complexas (*distillers dry solubles*) no crescimento celular e na produção do polissacarídeo e concluíram que a taxa de crescimento aumenta como aumento da concentração da fonte de nitrogênio, porém, é inibido na medida em que a quantidade de xantana aumenta no fermentado.

Charles e Radjai (1977) utilizaram soro de leite, subproduto da fabricação de queijo *cottage*, em que a lactose foi previamente hidrolisada com lactase imobilizada. Os pesquisadores testaram tanto o processo de batelada (48h, 60h e 96h) quanto o processo de batelada repetida (três ciclos de 100h). Os ensaios foram conduzidos em reatores de mistura de 7 litros com controle de temperatura (28°C) , pH (7,0) e espuma. A cinética foi similar a reportada na literatura e as concentrações finais de xantana foram de 1% (48h) a 1,6% (nos ciclos consecutivos de 100h). Os pesquisadores observaram um aumento na fase lag ao longo das bateladas do ciclo nas quais 10-15% do fermentado era deixado como inóculo para a próxima batelada. Este fato foi atribuído ao microambiente desfavorável das células que compunham o inóculo: o fundo do reator com agitação prejudicada.

Cadmus *et al.* (1977) avaliaram um meio sintético para a produção de goma xantana em fermentadores de 20 litros substituindo as fontes complexas de nitrogênio por fosfato de amônio. As fontes complexas estudadas foram subprodutos de destilarias de milho (sólidos solúveis secos de destilaria ou, em inglês, *dried distiller's solubles* - DDS), muito comum nos Estados Unidos que produz etanol de milho, e levedura de cerveja autolisada. O uso da fonte inorgânica de nitrogênio foi satisfatório levando à obtenção de bom rendimento e boa qualidade na goma produzida, medida tanto pela viscosidade final do caldo (6000-7000 cp – determinada em viscosímetro brookfield 30 rpm e 25°C) quanto pela proporção de ácido pirúvico (acima de 4%).

Souw e Demain (1979) investigaram os requerimentos nutricionais da linhagem *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Os resultados apontaram que a sacarose é tão boa quando a glicose como fonte de carbono e energia, dentre as fontes de nitrogênio testadas, o glutamato e sais de nitrato foram superiores aos sais de amônio e alguns ácidos orgânicos (como succinato e piruvato) estimularam a produção de xantana em determinadas concentrações quando a fonte de nitrogênio era o sulfato de amônio, porém a adição de ácido succínico inibiu a produção de goma quando se utilizou outros sais de amônio.

Outros pesquisadores estudaram os requerimentos nutricionais da *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Kennedy *et al.* (1982) estudaram várias fontes de nitrogênio complexas e verificaram que concentrações mais altas resultavam em maior rendimento e reduzido tempo de fermentação embora o produto obtido apresentasse qualidade reológica inferior, este fato foi atribuído à presença de maior quantidade de células bacterianas co-precipitadas com a goma.

Tait *et al.* (1986) estudaram o efeito da exaustão de nutrientes no meio de cultivo para a produção de xantana. A limitação de enxofre, íon amônio, fósforo, magnésio, ferro e glicose afetou tanto o crescimento (menores velocidades específicas de crescimento) quanto a qualidade da goma (menor proporção de ácido pirúvico).

García-Ochoa *et al.* (1992) avaliaram as necessidades nutricionais da *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 por meio de planejamento fatorial e definiram um meio sintético contendo concentrações ótimas de nutrientes importantes como nitrogênio, fósforo, magnésio e enxofre. O meio proposto pelos pesquisadores foi: ácido cítrico 2,1 g/L, NH₄NO₃ 1,144 g/L, KH₂PO₄ 2,866 g/L, MgCl₂ 0,507 g/L, Na₂SO₄ 0,089 g/L, H₃BO₃ 0,006 g/L, ZnO 0,006 g/L, FeCl₃.6H₂O 0,0024, CaCO₃ 0,020 e HCl 0,13 ml/L, com pH ajustado em 7,0 e concentração de sacarose de 20 g/L. Com esta formulação conseguiu-se 10 g/L de xantana em 24 horas de fermentação em frasco de 250 ml contendo 50 ml de meio incubado em mesa rotatória operando a 210 rpm e 28°C.

Lo *et al.* (1997) estudaram o efeito da razão carbono/nitrogênio (C/N) na produção de goma xantana em diferentes processos: batelada, batelada em dois estágios e batelada alimentada. Em geral, uma alta razão C/N aumentava a taxa de produção de xantana e o rendimento, porém diminuíam a velocidade específica de crescimento. Os resultados obtidos pelos pesquisadores estão de acordo com outros relatos de que a produção de

xantana ocorre em duas fases características, a primeira associada ao crescimento exponencial do microrganismo, em que o nitrogênio é substrato limitante, e a segunda associada à produção de goma na fase estacionária da curva de crescimento do microrganismo, em que a fonte de carboidrato é o substrato limitante.

Nitschke *et al.* (2001) avaliaram formulações a base de soro de leite para a produção de goma xantana pela linhagem *Xanthomonas campestris* C₇L. Esta linhagem não apresentou preferência pela glicose como a linhagem NRRL B-1459, mas exibiu o mesmo padrão cinético com relação à razão C/N apontada por Lo *et al.* (1997).

Casas *et al.* (2000) reportaram que o aumento da concentração de NH₄NO₃ provocou redução a capacidade viscosificante da goma, com aumento a proporção de acetato mas diminuição na proporção de piruvato, certamente por desvio metabólico do piruvato e glicose para a produção de biomassa conforme modelo metabólico proposto por Pons *et al.* (1989).

Em revisão da literatura, Rosalam e England (2006) enfatizaram que as alterações do meio de cultivo nas diferentes fases de crescimento do microorganismo afetam em muito a estrutura química e a massa molecular das moléculas de xantana sintetizadas bem como o rendimento da goma de modo que, de uma maneira geral, o produto final representa uma mistura de cadeias poliméricas de diferentes naturezas produzidas em diferentes fases do processo.

3.2.2 Cinética da fermentação

Moraine e Rogovin (1966) estudaram a cinética de produção da goma xantana pela linhagem *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 e observaram que o crescimento celular ocorre nas primeiras horas de fermentação com um rendimento de aproximadamente 9 g de células por grama de nitrogênio e que a produção de goma xantana não está associada somente ao crescimento, continuando sendo produzida mesmo após o fim da fase exponencial de crescimento com um rendimento de 75% por glicose consumida.

Moraine e Rogovin (1971), em outro estudo, cujos ensaios foram conduzidos em reator de mistura de 5 litros, evidenciaram que o controle do pH permitia aumentar a quantidade de glicose inicial para 5%, aumentar a concentração final de xantana produzida para 2,5-3% e reduzir o tempo de fermentação para 46 horas. O uso de NH₄OH para

controle de pH, entretanto, por ser uma fonte de nitrogênio, induziu um aumento da biomassa durante a fermentação reduzindo o rendimento de produto pelo substrato.

Schweickart e Quinlan (1989) estudaram a cinética da produção de xantana e biomassa com limitação de nitrogênio e glicose separadamente e confirmaram a existência de uma correlação linear baseado no modelo de Monod entre os pares (nitrogênio-biomasa) e (glicose/xantana) com rendimento específico $Y_{B/N}$ de 5,0 e $Y_{X/G}$ de 0,5, respectivamente.

O efeito da temperatura na cinética da fermentação de *Xanthomonas campestris* foi estudado por Shu e Yang (1989). Os pesquisadores relataram que temperaturas abaixo de 27°C favorecem o crescimento microbiano e, acima desta temperatura, a síntese de xantana inicia desde o começo da fase exponencial de crescimento. O rendimento em xantana variou de 54% na temperatura de 22°C a 90% na temperatura de 33°C. O grau de piruvilação, entretanto, foi maior no intervalo de temperatura de 27-30°C. Casas *et al.* (2000) reportaram que, em temperaturas em torno de 25-28°C, a massa molecular do polissacarídeo produzido é maior embora o conteúdo de acetato nas moléculas formadas tenha sido inferior. Os pesquisadores verificaram também que ocorre um aumento gradual da massa molecular média da xantana com o tempo de fermentação.

3.2.3 Processos e tipos de reatores

A maioria dos trabalhos relatados na literatura referentes ao estudo da produção de xantana utiliza reator de mistura e processo de batelada. Dentre os estudos de produção de xantana por processo de batelada utilizando reator de mistura, pode-se citar os trabalhos de (i) Moraine e Rogovin (1966), Rogovim *et al.* (1965) e Moraine e Rogovin (1973) que estudaram a cinética da produção de xantana em escala de laboratório (8L) e em escala piloto (230L e 2300L); (ii) Charles e Radjai (1977) que estudaram cinética da produção de xantana em reator (7L); (iii) Cadmus *et al.* (1978) que estudaram a produção de xantana em reator de 20L; (iv) Schweickart e Quinlan (1989) que estudaram a cinética da fermentação em reator de 1,2L; (v) Hans-Udo *et al.* (1989) que estudaram a influência da taxa de agitação na produção de goma xantana em reator de 10L; (vi) Herbst *et al.* (1992) que estudaram aspectos de transferência de oxigênio em reatores de mistura em função do tipo de impelidor e volume do reator (72L a 3000L); (vii) Ashraf *et al.* (1996) que estudaram a reprodutibilidade de fermentações com a linhagem

Xanthomonas campestris E-2 na produção de xantana em reatores de mistura de 14L, 20L e 150L.

O uso de processo contínuo na produção de xantana foi avaliado por alguns pesquisadores no intuito de aumentar a produtividade. Slodky e Cadmus (1978) relataram que o processo de fermentação contínua para produção de xantana não foi viável devido à degradação da linhagem. Após 6,5 a 8,7 ciclos passou produzir menos polímero e tornou-se uma linhagem do tipo pequena (S-type) conforme descrição de Cadmus *et al.* (1976). Patton e Dugar (1981) verificaram que a cultura contínua não era viável e sugeriram o uso de um processo de produção em dois estágios. O 1º estágio seria uma etapa para produção de células por um processo contínuo com alta velocidade específica de crescimento, próximo à máxima (0,33 h⁻¹), e tempo de residência de aproximadamente 2,5h mantendo-se a alimentação de substrato em valores ótimos. O 2º estágio seria uma etapa para a produção de goma em processo de batelada de aproximadamente 30h inoculada pela cultura celular produzida no primeiro estágio na qual a síntese da goma xantana seria continuada até se obter a concentração e rendimento desejados do polissacarídeo. Este processo em dois estágios teria a duração aproximada de 35h contra as 48h de uma batelada típica.

O processo de batelada repetida utilizando reator de mistura foi estudado por Charles e Radjai (1977), apesar de este não ter sido o foco principal de seu trabalho. Os pesquisadores avaliaram tanto o processo por batelada (48h, 60h e 96h) quanto por batelada repetida (três ciclos de 100h). A cinética foi similar a reportada na literatura e as concentrações finais de xantana foram de 1% (48h) a 1,6% (nos ciclos consecutivos de 100h). Os pesquisadores observaram um aumento na fase lag ao longo das bateladas do ciclo nas quais 10-15% do fermentado era deixado como inóculo para a próxima batelada. Este fato foi atribuído ao microambiente desfavorável das células que compunham o inóculo: o fundo do reator com agitação prejudicada.

Em bateladas típicas, não é possível manter altas velocidades específicas de crescimento celular juntamente com uma alta concentração de xantana no fermentado sem a aplicação de vigorosa agitação. Em uma batelada típica de 48 horas a agitação moderada e constante, a velocidade específica de crescimento cai de 18h⁻¹ para 0,04 h⁻¹ e o rendimento em goma também é reduzido. Aeração e agitação adequadas devem ser aplicadas para se conseguir alta produtividade evitando limitação de oxigênio e a existência de zonas estagnadas (Flores Candia e Deckwer, 1999).

Portanto, para melhorar a etapa de biossíntese *per se*, a escolha do tipo e desenho do biorreator é essencial garantir uma boa homogeneização do meio de cultivo altamente viscoso. Estudos de perfis de mistura em culturas microbianas altamente viscosas mostraram que o reator de coluna de bolha exibe melhor homogeneidade que o reator de mistura (Dusap e Gros, 1985 apud Pons *et al.*, 1988) embora uma redução do rendimento em xantana com o tempo tenha sido verificada com o uso de reator de coluna de bolha que foi correlacionada a uma queda simultânea do oxigênio dissolvido durante a síntese de xantana (Pons *et al.*, 1989).

Pace e Righelato (1981) apresentaram uma revisão sobre a produção de polissacarídeos extracelulares microbianos dando especial ênfase aos problemas de transferência de massa e energia associados ao desenvolvimento de culturas altamente viscosas e de natureza reológica não-newtoniana. Caldos fermentados ricos em xantana apresentam reologia tipicamente pseudoplástica, tendo sido reportada tixotropia e até efeito Weisssenberg característico de fluidos viscoelásticos. Este efeito foi atribuído à presença de cálcio no meio.

O gasto de energia pelo agitador é reduzido em fluidos viscoelásticos devido à formação de grandes cavidades atrás dos impelidores. Esta pseudoplasticidade, entretanto, faz com que a turbulência impressa pelo agitador seja mais pronunciada próximo aos impelidores, onde existe alta taxa de cisalhamento, do que em regiões mais afastadas, onde a reduzida taxa de cisalhamento torna a viscosidade aparente mais alta. Este gradiente de viscosidade em fluidos pseudoplásticos também promove a formação de um canal preferencial de passagem de ar na região central do reator e, portanto, uma grande variação no valor do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) de pontos próximos aos impelidores a pontos radialmente opostos (Pace e Righelato, 1981)

Por outro lado, estudos relacionados à difusividade de solutos de baixo peso molecular, como gases dissolvidos e nutrientes, demonstraram que esta permanece constante mesmo com a grande variabilidade reológica das soluções poliméricas. Foi relatada a ocorrência de alta taxa de coalescência das bolhas em culturas microbianas altamente viscosas com agitação deficiente e, conseqüentemente, a existência de regimes de Taylor caracterizado pela presença de grandes bolhas em forma de bala. Todos estes eventos característicos de culturas microbianas pseudoplásticas, se não controlados,

29

resultam numa oxigenação pobre do meio causando inibição do crescimento celular e redução do rendimento (Pace e Righelato, 1981).

Alguns estudos avaliaram o efeito da agitação no rendimento e qualidade da goma produzida. Moraine e Rogovin (1973) estudaram o efeito da agitação no crescimento celular e na produção de xantana. Os pesquisadores relataram que o crescimento bacteriano é inibido na medida em que a quantidade de xantana aumenta no fermentado, porém o aumento da agitação, quando a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida constante, provocou tanto aumento na taxa de crescimento celular quanto na taxa de formação do polissacarídeo sugerindo que a formação de uma camada de goma ao redor das células era responsável por dificultar a troca de nutrientes e oxigênio das células com o meio. Peters *et al.* (1989), entretanto, verificaram, por meio de microscopia eletrônica, que esta camada não era formada quando as células são cultivadas em tanques agitados mas somente quando crescidas em meio sólido.

Peters *et al.* (1989) verificaram que a limitação de oxigênio está mais relacionada à resistência na transferência de oxigênio do que à existência de zonas estagnadas no reator de mistura mas ressaltaram que em culturas contendo percentual de goma superior a 2% p/p o efeito da hidrodinâmica do reator pode ser importante. Papagianni *et al.* (2001) relataram que o aumento da agitação provoca aumento do rendimento em goma e da proporção de piruvato nas moléculas de xantana mas não afeta a massa molecular média da goma recuperada ao final da fermentação. Psomas *et al.* (2007) estudaram o efeito da agitação (10 a 600 rpm), temperatura (25 a 35°C)e tempo de cultivo (24h a 72h) na produção de goma xantana utilizando planejamento fatorial. Obviamente, um tempo maior de 72h e alta rotação do impelidor (600 rpm) maximizaram tanto a concentração final de xantana quanto de biomassa, a influência da temperatura foi similar a reportada por Shu e Yang (1989).

Suh *et al.* (1990) investigaram a produção de goma xantana em reator de coluna de bolha e verificaram que a massa molecular do polissacarídeo formado era menor durante a fase estacionária em condições de baixo consumo de oxigênio resultando num produto com menor capacidade viscosificante. Peters *et al.* (1993) correlacionaram o conteúdo de piruvato com o grau de suprimento de oxigênio nas amostras de xantana obtidas por Suh *et al.* (1990) em reator de coluna de bolha. O grau de suprimento de oxigênio foi definido como a razão entre a taxa de transferência de oxigênio (OTR) e a demanda potencial de oxigênio da cultura (qO_2^*). Os pesquisadores concluíram que quanto mais próximo de 1 estava a razão (OTR/qO_2^*) maior a quantidade de substituição de piruvato na cadeia polimérica.

Pons *et al.* (1990) avaliaram a performance de um reator de coluna de bolha (13L com L/D=13,6) contra a de um reator de mistura (3,6L) na produção de goma xantana em processo de batelada. Os pesquisadores verificaram que a concentração máxima de biomassa foi igual em todas as bateladas operando com os diferentes reatores e diferentes vazões de ar e agitação, sendo, portanto, independente do tipo de reator. Por outro lado, observou-se que o rendimento e produtividade em goma são dependentes da disponibilidade de oxigênio que, por sua vez, depende das características de transferência de oxigênio e homogeneização do reator. A performance do reator de coluna de bolha foi ligeiramente inferior à do reator de mistura devido à uma maior redução no valor de $k_{L}a$ somada, entretanto, a uma melhor capacidade de homogeneização do sistema.

Suh *et al.* (1992) compararam o desempenho reator de coluna de bolha e do reator *air-lift* na produção de goma xantana em processo de batelada e obtiveram melhor rendimento com o reator de coluna de bolha. A baixa performance do reator *air-lift* foi atribuída a um baixo suprimento de oxigênio no *downcorner*. Por outro lado, Kesser *et al.* (1993) conseguiram ótima performance em um reator *air-lift* com circulação externa forçada tendo obtido 25 g/L de xantana em 49h de operação em que após 36h verificou-se limtação de oxigênio.

Vuyst *et al.* (1987) avaliaram um processo de produção de batelada em dois estágios similar ao proposto por Patton e Dugar (1981) utilizando reator de mistura. O primeiro estágio, com duração de 25h, consistia de uma etapa de propagação da biomassa em meio rico em fonte de nitrogênio em um fermentador para alimentar dez fermentadores do segundo estágio para a produção da goma com meio de cultivo com alta razão C/N. Este segundo estágio teria uma duração de 95h com aumento gradual da agitação e aeração atingindo concentração final de xantana em torno de 2,7% p/p e rendimento global de 65%.

Shang-Tian *et al.* (1996) construíram um biorreator de 5L contendo um leito fibroso cilíndrico preso à haste do impelidor no qual as células bacterianas eram imobilizadas e cujo desenho contemplava recirculação do caldo fermentado do fundo do biorreator para o topo, no meio do cilindro fibroso. Esta configuração permitia um fluxo constante através do leito levando a uma constante remoção da xantana produzida e,

conseqüentemente, uma melhora na transferência de oxigênio do liquido para as células e aumento da produtividade. As fermentações foram conduzidas por processo de bateladas repetidas em diferentes velocidades de rotação do impelidor e diferentes volumes de trabalho, deixando o leito totalmente imerso ou com uma parte em contato com a fase gasosa.

Os pesquisadores conseguiram reduzir o tempo inicial de cada batelada de 100h para 24h mudando a estratégia de operação: rotação de 150 rpm com a matriz fibrosa totalmente imersa no líquido para rotação de 350 rpm com metade do leito submerso. O ciclo que operou a 150 rpm com o leito totalmente submerso compreendeu 4 bateladas de 100h e o ciclo que operou a 350 rpm com metade do leito submerso compreendeu 1 batelada inicial de 50 horas e 7 bateladas subseqüentes de 24h, totalizando 400h e 240h e atingindo uma concentração final de xantana de 2,0-3,5% p/v e 2,5-3,0% p/v, respectivamente. Este sistema operacional apresentou maior produtividade volumétrica à custa de uma alta concentração de células no leito apresentando, portanto, uma menor produtividade específica (produtividade/biomassa) quando comparado com um processo de batelada típico. As desvantagens deste tipo de processo para uso industrial, entretanto, são o alto gasto energético e maior possibilidade de contaminação por causa da circulação externa do fermentado através de uma bomba.

3.2.4 Recuperação

Um típico caldo fermentado de *Xanthomonas campestris* depois de 24 a 90 horas de fermentação, dependendo da linhagem, meio de fermentação e condições experimentais é composto de 1 a 4% (p/p) de xantana, 0,2 a 0,5% (p/p) de células, 0,1 a 1% (p/p) de carboidratos não utilizados pela bactéria, além de sais e outras substâncias que são adicionadas em menor quantidade ao meio para o crescimento celular. O sucesso na recuperação da xantana deve eliminar 95% do caldo fermentado e, para isto, métodos físicos e químicos são utilizados (García Ochoa *et al.*, 1993). A peça chave para se obter um processo viável é a etapa de recuperação e esta operação é comumente realizada por precipitação com alcoóis alifáticos de baixo peso molecular.

A recuperação de polissacarídeos microbianos extracelulares envolve, tipicamente, precipitação com álcool e/ou sal, separação do precipitado, conversão do precipitado a sua forma solúvel, remoção da água, secagem e moagem. Operações unitárias adicionais como

remoção das células, inativação de enzimas indesejáveis e modificação química ou enzimática do polissacarídeo também podem ser empregadas (Pace, 1981).

Rogovin *et al.* (1965), frente ao crescente interesse comercial pela goma xantana, propuseram um processo de produção de goma xantana de grau industrial com menor pureza e baixo custo para casos em que o grau de pureza não é fator importante como, por exemplo, o uso na recuperação de petróleo. A novidade do processo estava na recuperação do produto que, na verdade, foi resumida a uma única etapa que consistia na secagem do fermentado em secador de tambor (*drum drying*) ou em atomizador (*spray drying*), eliminando gastos com o agente precipitante e lavagem do produto final. No processo de secagem, temperaturas superiores a 140°C causavam perda de qualidade viscosificante da goma, temperaturas menores garantiam um produto com boa qualidade viscosificante. O custo avaliado pelos pesquisadores, naquela época, foi de US\$0,9/kg.

Estudos realizados para recuperação de xantana em solução aquosa, utilizando o etanol como agente precipitante, demonstraram que o tipo de sal empregado e concentração de etanol utilizada são as variáveis mais importantes (Gonzales et al. 1989). Os pesquisadores utilizaram planejamento fatorial de dois níveis para verificar o efeito de quatro variáveis na recuperação de xantana em solução aquosa utilizando etanol como agente precipitante. Os efeitos estudados foram concentração de sal $(0,1 \text{ e } 1,0 \text{ p/v } \text{H}_20)$, o tipo de sal (NaCl e KCl), concentração de etanol (30 e 65% v/v) e temperatura (15 e 25 °C). No que diz respeito ao teor de álcool utilizado na precipitação, a recuperação de xantana dobrou quando utilizada a maior concentração de álcool. O sal KCl, adicionado para reduzir a quantidade de álcool utilizada na precipitação, teve melhor desempenho quando comparado ao sal NaCl. A temperatura e a concentração de sais não tiveram efeitos significativos neste estudo. Maiores rendimentos foram alcançado com 1% de sal e 65% de etanol. A interação entre a concentração de álcool e a concentração de sal (em baixas quantidades) sugere que a xantana se comporta como proteínas em resposta a mudança na constante dielétrica e força iônica. O sal afeta a estrutura primária da xantana, por aumentar o número de cátions ligados aos grupos ionizados da molécula, um fenômeno que leva a mudança da carga e subseqüente precipitação. Altas concentrações de sal podem resultar em alterações na conformação da xantana, formando fitas flexíveis.

Levando em conta a influência do agente precipitante, da concentração de xantana e a adição de sais, García Ochoa *et al.* (1993) estudaram a precipitação de xantana. Ao caldo fermentado obtido foram adicionados agentes de precipitação – etanol, acetona e isopropanol – e, em seguida, a mistura foi agitada em alguns casos sais foram empregados e adicionados à solução de xantana antes da adição do agente precipitante. A xantana precipitada foi removida por filtração a vácuo e seca a 60°C. Verificou-se que para a precipitação da xantana é necessária uma maior quantidade de etanol, quando comparada a quantidade de acetona e isopropanol, verificou-se ainda que a quantidade de isopropanol necessário é levemente menor que a de acetona. A razão entre o agente precipitante e volume da solução de xantana necessária é de 6 para o etanol e 3,6 e 3,2 para acetona e isopropanol, respectivamente. No que diz respeito à adição de sais, foram testados os cloretos de cálcio, magnésio, amônio, sódio e potássio na concentração de 1g/L para avaliar o efeito da valência dos cátions precipitados com a as moléculas de xantana de natureza polieletrolítica. A adição de sais divalentes permitiu a maior redução na utilização isopropanol para precipitação. Apesar de estes sais colaborarem na redução do agente precipitante de xantana, a goma xantana produzida tem a desvantagem de ser menos solúvel.

Em trabalho realizado por Galindo *et al.* (1996) foram testados dois modelos de pás - *marine propeller* (hélice náutica) *e Rushton turbine* (turbina de *Rushton*) - utilizadas para promover a agitação na etapa de precipitação de xantana de caldos fermentados bem como foram estudados os efeitos da concentração do de KCl, da quantidade de álcool adicionada e do aquecimento do caldo fermentado no rendimento e na qualidade e pureza do produto final. Quando a pá utilizada foi do tipo *marine propeller*, obteve-se maior pureza do produto final, indicando que a aplicação de um fluxo vigoroso é mais importante que a aplicação de alta taxa de cisalhamento na lavagem das fibras. O melhor rendimento na precipitação da xantana foi obtido com adição de KCl (3% p/p_{goma}) em caldo aquecido a 110°C por 15min em autoclave. Foi conseguida 99% de recuperação da xantana em caldos contendo 25g/L de xantana submetidos a aquecimento, utilizando a pá *marine propeller*, com adição de KCl (p/p_{goma}) e 1,4 vezes o volume de álcool por volume de caldo.

Devido ao alto custo na etapa de recuperação, Lo *et al.* (1997) propuseram a inclusão de uma etapa de ultrafiltração para concentrar o caldo fermentado de xantana antes da precipitação com álcool e avaliaram a eficiência energética deste processo. Um fluxograma deste processo incluindo a etapa de ultrafiltração está apresentado na Figura 8.



FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE XANTANA INCLUINDO ETAPA DE ULTRAFILTRAÇÃO SEGUNDO

A ultrafiltração mostrou ser um método econômico para a concentração de caldo fermentado contendo xantana. A redução da quantidade de álcool e energia utilizados no processo de recuperação de xantana foi de 80%. Ainda foi evidenciado que mais de 45% dos custos do processo de recuperação de xantana podem ser economizados utilizando o processo de ultrafiltração. A performance do processo e a economia podem ser afetados pela diferença de pressão transmembrana, taxa de cisalhamento e concentração de xantana. Os autores sugeriram que o preço para o processo de ultrafiltração é de US\$0,16/kg xantana.

Após a primeira etapa de concentração do polissacarídeo conforme apresentado, o mesmo deve ser prensado ou centrifugado para remover a parte líquida em excesso para aumentar a pureza do produto e diminuir custos da operação de secagem. A xantana precipitada deve receber tratamentos com óxido de propileno, glutaraldeído, por exemplo, para destruir a atividade da celulase antes da secagem com ar ou com glioxal para aumentar a dispersão do produto final. Os precipitados de polissacarídeos são geralmente secos em bateladas ou em secadores contínuos sobre vácuo ou ar forçado, ou ainda com gás inerte caso os sólidos contenham solventes orgânicos inflamáveis. As condições de secagem devem ser cuidadosamente escolhidas para não prejudicar a solubilidade e evitar a degradação e descoloração (Smith and Pace, 1982). O polissacarídeo seco é moído em malha predeterminada para controle de dispersão e da taxa de dissolução, bem como para facilitar a manipulação. Cuidado especial deve ser tomado para que a etapa de moagem não degrade o produto pelo aquecimento. Os polissacarídeos são usualmente secos até 10% de umidade (Smith and Pace, 1982).

4 Material e Métodos

4.1 Microrganismo

Os ensaios foram iniciados com a linhagem *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Esta linhagem havia sido adquirida pelo laboratório de Biotecnologia e Processos do CPQBA/UNICAMP em 2001 para um projeto que acabou não sendo desenvolvido. Esta linhagem, portanto, ficou estocada em criotubos em freezer comum a -18°C por aproximadamente três anos. Os resultados dos ensaios conduzidos com esta linhagem indicaram perda da qualidade da goma e produtividade que pode ter tido como causa o longo tempo de estoque dos criotubos.

Por este motivo, fez-se a compra da linhagem de *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 diretamente da *American Type Culture Collection* (ATCC) que, na verdade, é a NRRL B-1459 depositada pelo próprio Northern Regional Research Laboratory (agora denominado National Center For Agricultural Utilization Research - NCAUR) na ATCC que designou a ela novo código. A linhagem ATCC 13951, portanto, corresponde a linhagem NRRL B-1459 e é também designada de ICMP 8425, ICPB XC 153 e NCIB 11803. A descrição da linhagem ATCC 13951 no sítio da ATCC faz menção à instabilidade da linhagem por manutenção inadequada relatada por Cadmus *et al.* (1976).

No presente trabalho, portanto, far-se-á distinção a linhagem estocada por longo período em freezer e com suspeita de degradação genética (NRRL B-1459*) e da linhagem comprada diretamente da ATCC (ATCC 13951). Neste trabalho, utilizou-se também a linhagem ATCC 55298 adquirida diretamente da *American Type Culture Collection* (ATCC) que é uma variante espontânea da ATCC 13951 resistente à rifampicina isolada segundo metodologia descrita na patente US 5,310,677 de propriedade da Shin-Etsu Bio, Inc. e depositada na ATCC por exigência do tratado de Budapeste. A linhagem é designada na patente como X59.

A linhagem ATCC 55298 ou X59, portanto, está protegida pela Lei de Propriedade Intelectual dos Estados Unidos até 2012. Na Europa, a mesma patente foi depositada e a matéria foi concedida segundo exigências locais (EP0287363B1). Esta patente, entretanto, teve seu prazo de validade expirado (04/2008). A patente não foi depositada no Brasil de modo que a linhagem pode ser explorada no território brasileiro. De qualquer forma, qualquer matéria objeto de proteção patentária pode ser utilizada para fins de pesquisa acadêmica conforme disposto no TRIPS (Acordo sobre Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual relacionados ao Comércio, ADPIC - TRIPS).

4.1.1 Conservação

As linhagens adquiridas diretamente da ATCC foram reativadas e mantidas Laboratório de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP. Um único repique em YMA foi cedido para o laboratório de Biotecnologia e Processos do CPQBA/UNICAMP e um lote de criotubos foi preparado a partir desta amostra para a realização dos ensaios.

As linhagens ATCC, cedidas na forma de cultura fresca em YMA pelo Laboratório de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP, e a linhagem NRRL B-1459* preservada em criotubos a -18°C e previamente descongelada, foram repicadas em frascos contendo 50 ml de YM esterilizado. Os frascos foram incubados em uma incubadora agitada a 28°C e 150 rpm. por 24 horas. Aos frascos contendo a cultura fresca foram adicionados 50 ml de solução aquosa de glicerol 40% estéril. Porções de 3 ml desta suspensão celular foram adicionadas em criotubos com o auxílio de pipetas graduadas, ambos previamente esterilizados. Os criotubos foram submetidos a congelamento rápido por imersão em uma solução de etanol comercial (92,8%) e gelo seco (-80°C) por 2 minutos. Os criotubos foram conservados em freezer a -18°C. A composição do meio de cultivo YM e YMA está descrita na Tabela 2.

Componente	Concentração (g/l)
Glicose	10,0
Extrato de Levedura	3,0
Extrato de Malte	3,0
Peptona	5,0
Agar (somente para YMA)	20,0

TABELA 2 -	Composição do) MEIO DE (CULTIVO YM
------------	---------------	-------------	------------

4.1.2 Pré-Inóculo e Inóculo

O pré-inóculo foi preparado inoculando-se um frasco contendo 100 ml de YM estéril com o conteúdo de dois criotubos descongelados em temperatura ambiente por

aproximadamente 1 hora. O frasco foi mantido por 24 horas em incubadora agitada a 28°C e 150 rpm. O inóculo foi preparado a partir da transferência de 10 ml da cultura fresca crescida em YM (pré-inóculo) para frascos contendo 100 ml de meio para produção de goma estéril. A composição do meio para produção de goma xantana está descrita na Tabela 3 e o esquema de preparo do inóculo está mostrado na Figura 9.

Componente	Concentração (g/l)
Sacarose	25,0
Fosfato de potássio dibásico	5,0
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,20
Sulfato de amônio	2,0
Ácido cítrico	2,0
Ácido Bórico	0,006
Óxido de zinco	0,006
Cloreto de férrico hexahidratado	0,02
Carbonato de cálcio	0,02
Ácido clorídrico	13 ml
Hidróxido de sódio	ajustar pH = $7,0$

TABELA 3 - MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA



FIGURA 9 - PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O meio de produção de goma é uma adaptação do meio otimizado por García-Ochoa et al. (1992). A quantidade de sacarose foi diminuída devido ao menor tempo de fermentação e, conseqüentemente, menor consumo do substrato. O nitrato de amônio foi substituído por sulfato de amônio e o cloreto de magnésio foi substituído por sulfato de magnésio respeitando-se a proporção estequiométrica dos elementos essenciais: nitrogênio e magnésio. Para o preparo do meio para produção de goma xantana, foi preparada uma solução 100 vezes mais concentrada dos componentes presentes em baixas concentrações. O oxido de zinco foi dissolvido no ácido clorídrico e o ácido bórico, cloreto férrico hexaidratado e o carbonato de cálcio foram pesados e dissolvidos separadamente. Em seguida, estes sais foram todos misturados em balão volumétrico juntamente com a solução ácida de cloreto de zinco resultando na solução concentrada de sais. O pH do meio foi ajustado em 7,0 com hidróxido de sódio 50% p/p antes da esterilização.

4.2 Processo em batelada repetida

4.2.1 Escala laboratório

4.2.1.1 Descrição do sistema operacional

Os ensaios foram conduzidos em um reator de vidro borossilicato encamisado de 30 cm altura por 6 cm diâmetro interno totalizando um volume de 850 ml. As extremidades do reator foram vedadas por rolhas de borracha através das quais foram inseridos tubos de vidro para fazer a conexão com mangueiras externas para a entrada e saída de ar, entrada de antiespumante e meio para produção de goma. Uma saída lateral, a uma altura de 4,4 cm do fundo do reator, foi projetada a fim de retirar amostra e o fermentado ao final de cada batelada. Bombas peristálticas da Masterflex foram utilizadas para realizar as operações de adição de meio e antiespumante e saída de fermentado.

A aeração do reator foi feita por meio de um distribuidor de vidro sinterizado e ajustada por um rotâmetro de acrílico modelo FR2A29 da Key Instruments. Na entrada e na saída de ar, foram conectados dois filtros de vidro contendo algodão hidrofóbico para manter o sistema estéril. Um Erlenmeyer foi colocado entre a saída de ar do reator e o filtro para servir de tanque pulmão caso houvesse vazamento por excesso de espuma no reator. O controle da temperatura foi feito por meio de um banho termostático da Tecnal dotado de sistema de bombeamento que mantinha água circulando na camisa do reator. A Figura 10 mostra uma fotografia do sistema em operação em que alguns componentes estão indicados.

O volume de trabalho no reator foi de 660 ml em todas as bateladas. Na batelada inicial, adicionou-se 600 ml de meio para produção de goma xantana e 60 ml de inóculo e, nas bateladas seguintes, em que parte do fermentado da batelada anterior foi deixado no

reator (cerca de 124 ml), o volume de trabalho foi completado até 660 ml com meio para produção de goma estéril.



FIGURA 10 - SISTEMA OPERACIONAL: (1) REATOR DE VIDRO ENCAMISADO, (2) BANHO TERMOSTÁTICO, (3) ROTÂMETRO, (4) BOMBAS PERISTÁLTICAS - (A) ENTRADA DE MEIO, (B) ENTRADA DE ANTIESPUMANTE E (C) SAÍDA DE FERMENTADO -, (5) FILTROS DE AR, (6) TANQUE PULMÃO E (7) ANTI-ESPUMANTE.

4.2.1.2 Preparo e inoculação do reator

Ao reator foram conectados todas as mangueiras, os filtros de ar e o frasco de antiespumante e, em seguida, foi adicionado 600 ml de meio de produção de goma. Esta parte do sistema foi então esterilizada em autoclave por 20 minutos a 121°C. O inóculo foi adicionado pelo topo retirando-se a rolha sob chama do bico de Bunsen em uma sala de inoculação até uma altura correspondente ao total de 660ml.

4.2.1.3 Procedimentos de operação e amostragem

Após a inoculação, foram feitas as conexões das mangueiras com o sistema de ar comprimido e com o banho termostático. A vazão de ar e a temperatura foram devidamente ajustadas às condições do ensaio. Uma amostragem foi feita ao inicio de cada batelada e a cada 24 horas, perfazendo um total de 3 amostragens: 0h, 24h e 48h. Ao final de 48 horas, finalizava-se a batelada e se retirava parte do fermentado até a altura da saída lateral. Em seguida, foi adicionado o meio de cultivo para produção de goma até uma altura de

aproximadamente 23 cm do fundo do reator referente ao total de 660 ml. O meio fresco foi previamente preparado e esterilizado em um Erlenmeyer de 1 litro. O Erlenmeyer foi fechado por meio de uma rolha através da qual passavam dois tubos de vidro: um para equilibrar a pressão, contendo algodão hidrofóbico para manter o ambiente estéril, e outro conectado com uma mangueira interna que ia até o fundo do frasco e uma mangueira externa dotada de um conector de vidro tipo macho-fêmea na extremidade para ser realizar a transferência de meio. A Figura 11 mostra o esquema dos ensaios.



FIGURA 11 - ESQUEMA DOS ENSAIOS

4.2.2 Escala piloto

O ensaio em escala piloto foi conduzido em um reator tipo bolha de volume total de aproximadamente 400L (1,65 m de altura por 0,55 m de diâmetro; L/D=3) e operado com aproximadamente 70% de volume de fermentado. O inóculo foi propagado em três etapas: (1) dois frascos Erlenmeyer contendo 50 ml de YM foram inoculados com o conteúdo de dois criotubos, (2) 50 ml da cada cultura fresca da primeira etapa foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 1L contendo 500 ml de YM, (3) a cultura fresca da segunda etapa totalizando 1 L foi inoculada num garrafão de contendo 10L de YM. Os frascos inoculados nas etapas (1) e (2) de propagação foram incubados em mesa rotatória por 24h a 28°C e 175 rpm e o crescimento no garrafão foi feito com aeração de 1 vvm sem controle da temperatura. Para se conseguir um crescimento mais vigoroso no garrafão, foi desenhado um distribuidor de ar com mangueiras para permitir a passagem na boca do garrafão.

A esterilização das linhas e do reator foi realizada com injeção direta de vapor por 20 minutos. O meio de cultivo foi esterilizado previamente num tanque mistura de 200 L com injeção direta de vapor por 20 minutos e temperatura controlada em 120±5°C. O meio foi transferido para o reator após esterilização das linhas de transferência e, no caso da primeira batelada, foi previamente inoculado como conteúdo do garrafão.

As fermentações foram conduzidas a temperatura de 28°C e estratégias de aeração variadas. As amostragens foram realizadas em diferentes tempos para cada batelada e os procedimentos de análise de quantificação de goma, biomassa e sacarose no fermentado foram os mesmos utilizados para os ensaios em escala laboratório apresentados a seguir.

4.3 Recuperação da goma

A goma foi recuperada do fermentado por precipitação com etanol. A etapa de separação das células bacterianas não foi realizada uma vez que optou-se pela produção de xantana grau industrial, ou seja, sem maior grau de purificação. A proporção de etanol para fermentado foi de 5:1 v/v para as amostras de 10 ml e de 2:1 para a amostra de fermentado retirada ao final de cada batelada. A goma xantana precipitada foi filtrada a vácuo utilizando-se um filtro de Buchner e um kitassato ligado a uma bomba de vácuo. A goma xantana recuperada foi secada em estufa a 55±5°C por 24 horas e em seguida pesada. No caso do fermentado final, a goma foi ainda macerada e estocada em frascos fechados em geladeira para posterior análise reológica. A Figura 12 ilustra o procedimento para a recuperação da goma xantana.



FIGURA 12 - PROCEDIMENTO PARA RECUPERAÇÃO DA GOMA

4.4 Determinação da biomassa

Foram realizados cinco ensaios para se construir uma curva de calibração para determinação da concentração em massa (biomassa) das células de *Xanthomonas*

campestris por turbidimetria, ou seja, a partir da medida da absorbância do fermentado a 540 nm e 600 nm diluído de 5 a até 30 vezes com água destilada. Todos estes ensaios foram realizados para se avaliar tanto a cinética de crescimento no meio YM quanto para se avaliar a influência da xantana na absorbância do caldo fermentado e se chegar a uma correlação confiável entre as variáveis massa seca de células e absorbância do fermentado.

Para a obtenção da biomassa, todos os ensaios consistiram de três etapas: (1) obtenção do pré-inóculo, (2) obtenção do inóculo e (3) obtenção da biomassa em diferentes concentrações por variação no tempo de cultivo ou quantidade de inóculo. Na primeira etapa, o pré-inóculo foi preparado a partir da incubação do conteúdo de dois criotubos contendo a linhagem *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 em um frasco Erlenmeyer (250 ml) contendo 50 ml de YM em incubadora a 175 rpm e 28°C por 24 horas. Na segunda etapa, o inóculo foi preparado pelo repique de 10 ml da cultura fresca (pré-inóculo) em um frasco Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de YM em incubadora a 175 rpm e 28°C por 24 horas. A terceira etapa consistiu em incubar um frasco Erlenmeyer (250 ml) contendo 100 ml de YM em incubadora agitada a 175 rpm e 28°C com quantidade de inóculo e tempo de incubação variáveis conforme descrito nas próximas seções. Nesta última etapa, em todos os ensaios, exceto para o ensaio 4, para cada condição de quantidade de inóculo e tempo de incubação foram preparados 3 frascos (ensaio em triplicata).

Em todas as etapas, os frascos contendo o meio de cultivo foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave e a inoculação dos frascos foi realizada com o auxílio de pipetas graduadas previamente esterilizadas e um pipetador automático numa sala de inoculação sob a chama do bico de Bunsen.

A quantidade de biomassa formada foi determinada por gravimetria (massa seca). Esta metodologia consiste em separar por centrifugação as células do caldo fermentado e secá-las em estufa até peso constante. No caso de amostras de caldo fermentado de *Xanthomonas campestris*, é necessária uma prévia diluição para reduzir a viscosidade e facilitar a sedimentação celular.

Nos ensaios realizados, uma amostra de 40 ml de fermentado foi diluída com água destilada na proporção em massa de cinco vezes e uma parte deste caldo diluído (cerca de 20 ml) foi retirado para medida de absorbância num espectrofotômetro FEMTO modelo 600 S. O restante caldo diluído foi, então, centrifugado em uma centrífuga Beckman

Coulter Avanti J-25 a 12.000 rpm por 10 minutos. As células foram lavadas com água destilada e novamente centrifugadas. Este procedimento foi repetido mais uma vez para eliminação de traços de goma xantana aderida nas células e, em seguida, a biomassa recuperada foi vertida em uma placa de vidro previamente pesadas em balança analítica para secagem. A secagem da massa celular foi realizada em um estufa com recirculação de ar forçada a 50°C. Após secagem, as placas contendo a biomassa foram novamente pesadas.

Cabe mencionar que, quando a linhagem *Xanthomonas campestris* é cultivada no meio YM, a quantidade de goma produzida é pouca, cerca de 3 g/l ao final do crescimento exponencial, mas o suficiente para influenciar na medida da absorbância como será discutido na seção Resultados e Discussão. Portanto, fez-se necessário determinar a influência da presença da goma na absorbância do fermentado. Para tanto, foram preparadas soluções aquosas de goma xantana grau alimentício em diferentes concentrações e a absorbância destas soluções nos comprimentos de onda de 540 nm e 600 nm foi medida. Com isso, construiu-se uma curva de concentração goma xantana versus absorbância para se avaliar a influência da presença da goma na medida da absorbância do caldo fermentado. A amostra de goma xantana de grau alimentício foi gentilmente cedidas pela CPKelco, por meio do engenheiro Flavio A. Tanaka.

A determinação da quantidade de goma xantana bruta foi feita somente para os ensaios 3, 4 e 5. A recuperação da goma xantana bruta foi realizada por precipitação com etanol segundo metodologia descrita na Seção 4.3 utilizando uma proporção 1:5 v/v de fermentado para etanol. No ensaio 5, ainda foi realizada a recuperação da goma xantana pura, livre de células. Para tanto, a goma xantana presente no sobrenadante do caldo diluído centrifugado foi precipitada com isopropanol na proporção de 1:5 v/v de sobrenadante para isopropanol.

4.4.1 Ensaio Biomassa 1

Neste primeiro ensaio, foram inoculados 15 frascos contendo 100 ml de YM com 10 ml de cultura fresca (inóculo) de *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 preparada conforme descrito na seção 4.4. As amostragens foram realizadas em intervalos de tempo de três horas a partir da oitava hora após a inoculação, ou seja, nos tempos 8h, 11h, 14h, 17h e 20h.

4.4.2 Ensaio Biomassa 2

No segundo ensaio, a quantidade de inóculo foi variada e o tempo de fermentação foi fixado em 20 horas. Foram inoculados 15 frascos contendo 100 ml de YM e cada conjunto de três frascos foi inoculado com 0,1 ml, 1 ml, 2,5 ml, 5 ml e 10 ml de cultura fresca (inóculo) de *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 preparada conforme descrito na seção 4.4.

4.4.3 Ensaio Biomassa 3

Neste ensaio, variou-se a quantidade de inóculo e o tempo de fermentação. Foram inoculados 15 frascos contendo 100 ml de YM e cada conjunto de três frascos correspondeu a uma das seguintes condições de (quantidade de inóculo / tempo de fermentação): (2,5 ml / 44 h), (5 ml / 44 h), (5 ml / 44 h), (5 ml / 66 h) e (10 ml / 66 h).

4.4.4 Ensaio Biomassa 4

Neste ensaio, foram inoculados quatro frascos de YM segundo descrito na seção 4.4. Após 20 horas de incubação, as amostras de caldo fermentado dos frascos foram misturadas num só frasco e, em seguida, diluídas com água destilada seqüencialmente em várias proporções: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:14, 1:19, 1:24 e 1:29 p/p de fermentado para água destilada. As diluições e respectivas medidas de absorbância foram realizadas em triplicata.

4.4.5 Ensaio Biomassa 5

Neste último ensaio, foram inoculados 15 frascos contendo 100 ml de YM com 10 ml de cultura fresca (inóculo) de *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 preparada conforme descrito na seção 4.4. As amostragens foram realizadas em intervalos de tempo de 12 horas a partir de 24 horas após a inoculação, ou seja, nos tempos 24h, 36h, 48h, 60h, e 72h.

4.5 Determinação dos parâmetros reológicos

A metodologia empregada neste trabalho para se determinar os parâmetros reológicos da goma xantana foi baseada na norma API RP 13B-1 (*Recommended Practice Standard Procedure for Field Testing Water-Based Drilling Fluids*), utilizada pela indústria

do petróleo para avaliar a qualidade dos viscosificantes para os fluidos usados na exploração e produção de poços de petróleo e gás.

As soluções aquosas destes viscosificantes são caracterizadas por apresentarem comportamento reológico pseudoplástico. O modelo matemático mais simples que descreve este perfil de escoamento é a Lei da Potencia: $\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$ em que *n* é o índice de comportamento de fluxo e *k* é o índice de consistência.

O parâmetro n fornece informações acerca do grau de pseudoplasticidade do fluido: quanto mais o seu valor está afastado da unidade, mais pseudoplástico é o fluido. O parâmetro k determina a magnitude da viscosidade aparente: quanto maior o valor de k, maior será a viscosidade aparente do fluido.

A equação deste modelo pode ser linearizada aplicando o logaritmo dos dois lados. A equação linearizada assume, então, a forma: $\log \tau = \log k + n \log \dot{\gamma}$. A partir de dados de tensão *versus* taxa de cisalhamento, faz-se uma regressão linear de $\log \tau$ *versus* $\log \dot{\gamma}$ e se obtém os valores do coeficiente linear log k e do coeficiente angular n.

4.5.1 Preparo da Amostra

Inicialmente, preparou-se o fluido base conforme o número de amostras e a quantidade de amostra disponível para o teste. O fluido base é uma solução salina que mimetiza a água do mar, utilizada no preparo da lama de perfuração. Este fluido base é preparado com água deionizada e com os seguintes sais: 60 g/l de NaCl, 0,2 g/l de CaCl e 0,08 g/l de MgCl₂, todos de qualidade padrão para análise (PA).

A solução aquosa de goma xantana é preparada em etapas. Estes passos são necessários uma vez que as partículas da goma tendem a se agregar formando aglomerados insolúveis e mascarando a concentração final da solução. Para auxiliar na dissolução da goma, utilizou-se um misturador de haste única modelo M-936 do fabricante Hamilton Beach. As etapas de preparo da solução aquosa de goma xantana consistiram de:

 Pesar a amostra de xantana a ser analisada numa balança analítica de modo a resultar numa solução com concentração de 4,3 g/l em fluido base;

2) Transferir o volume desejado de fluido base para o copo do misturador ligando-o em velocidade baixa;

46

3) Adicionar a amostra de xantana ao fluido base ao longo de 5 minutos, ou seja, adicionar pequenas quantidades do pó por vez, mantendo a velocidade do misturador baixa;

4) Decorridos os 5 minutos e completada a adição de amostra, interromper a agitação uma única vez, durante, no máximo, um minuto, para raspar qualquer material que aderido às paredes do recipiente, reincorporando-o à solução;

5) Continuar a agitação na velocidade baixa por mais 10 minutos.

Após esta etapa de dissolução, a solução foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 1 litro tampado com plástico filme e este foi levado a uma estufa incubadora rotativa operando a 100 rpm e 50°C por 16 horas. Após este período, os frascos foram colocados em um banho de água termostatizado à temperatura de 22°C para resfriamento. É importante ressaltar que, ao retirar o frasco da incubadora rotativa, deve-se tomar cuidado para não incorporar ar a solução que irá ser analisada no viscosímetro. Para tanto, deve-se evitar agitar da solução após esta etapa.

4.5.2 Análise Reológica

Utilizou-se um viscosímetro de cilindros coaxiais modelo 900 do fabricante OFITE. Este viscosímetro foi especialmente projetado para análise de fluidos de perfuração. Ele opera a taxa de cisalhamento controlada pelo cilindro rotacional externo (Figura 13(b)) e a tensão impressa pelo fluido no cilindro interno (Figura 13(a)) é medida pela deflexão de uma mola de torção. A operação do viscosímetro é simples, entretanto, o processo de adição da solução a ser analisada requer certos cuidados.

A solução aquosa de xantana (aproximadamente 140 ml) deve ser transferida de modo a não incorporar ar à amostra. Para isso, a amostra deve ser vertida lentamente encostando a boca do frasco Erlenmeyer no copo do viscosímetro, formando um filete do fluido descendo pela parede do copo. Pode-se também utilizar uma pipeta graduada (20 ml ou mais) transferindo pequenos volumes por vez. Em seguida, o copo é colocado no compartimento de controle de temperatura (Figura 13 (c)) e a plataforma é elevada até que a superfície do fluido alcance uma linha de marcação no cilindro externo (Figura 13(d)).



FIGURA 13 - VISCOSÍMETRO OFITE 900

A leitura dos pontos de taxa de cisalhamento *versus* tensão é realizada em diferentes rotações controladas pelo Viscosimetro OFITE 900, cada uma correspondendo a uma taxa de cisalhamento específica conforme apresentado na Tabela 4. A aplicação do cisalhamento no fluido é iniciada com uma rotação de 600 rpm e sucessivamente reduzida até a rotação de 1 rpm para evitar qualquer efeito de tixotropia do fluido. A leitura da tensão é realizada após decorrido 1 minuto do inicio do cisalhamento para dar tempo de resposta ao fluido frente à taxa de cisalhamento aplicada e, assim, obter uma leitura confiável.

TABELA 4 - RELAÇÃO ENTRE ROTAÇÃO E TAXA DE CISALHAMENTO DO VISCOSIMETRO OFITE 900

ω(rpm)	600	300	200	100	60	30	10	6	3	1
$\gamma(s^{-1})$	1021,38	510,69	340,46	170,23	102,14	51,07	17,02	10,21	5,11	1,7

A metodologia do API RP 13B-1 realiza somente as leituras das rotações 600, 300, 200 e 100 rpm, entretanto, no presente trabalho, foi feita a leitura em toda a faixa de cisalhamento permitida pelo viscosímetro para posterior escolha da região a ser utilizada na determinação dos parâmetros.

4.6 Ensaio de estabilidade térmica da goma xantana

Os ensaios de estabilidade da goma xantana consistiram em submeter o fermentado a diferentes condições de tempo e temperatura de aquecimento. Os tempos foram de 10 e 20 minutos e as temperaturas foram de 90°C, 100° C, 110° C e 121° C.

O fermentado foi preparado em três etapas. A primeira etapa consistiu em preparar o pré-inóculo a partir da incubação do conteúdo dois criotubos da linhagem *Xanthomonas* *campestris* ATCC 13951 em um frasco Erlenmeyer (250 ml) contendo 50 ml de YM em incubadora rotativa operando a 175 rpm e 28°C por 24 horas. A segunda etapa consistiu em preparar o inóculo a partir do repique de 10 ml da cultura fresca do pré-inóculo em cada um dos quatro (4) frascos Erlenmeyer (250 ml) contendo 100 ml de YM. Estes frascos foram incubados em uma incubadora rotativa operando a 175 rpm e 28°C por 24 horas. A terceira etapa consistiu em preparar o fermentado rico em goma xantana a partir do repique de 10 ml da cultura frascos Erlenmeyer (250 ml) contendo 100 ml de YM. Estes frascos foram incubados em uma incubadora rotativa operando a 175 rpm e 28°C por 24 horas. A terceira etapa consistiu em preparar o fermentado rico em goma xantana a partir do repique de 10 ml da cultura fresca do inóculo em cada um dos trinta frascos Erlenmeyer (250 ml) contendo 100 ml de meio para produção de goma conforme definido na Seção 4.1.2. Estes frascos foram incubados em uma incubadora rotativa operando a 175 rpm e 28°C por 72 horas.

Em todas as etapas, os frascos contendo o meio de cultivo foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave e a inoculação dos frascos foi realizada com o auxílio de pipetas graduadas previamente esterilizadas e um pipetador automático numa sala de inoculação sob a chama do bico de Bunsen.

Decorridas 72 horas de fermentação, o conteúdo dos 30 frascos, totalizando 3300 ml, foi vertido em um Becker e misturado para garantir uniformidade do fermentado a ser analisado. Antes do tratamento térmico, uma amostra do caldo fermentado foi submetida a análise reológica, conforme metodologia descrita a Seção 4.5 excluindo-se a etapa de preparação da amostra uma vez que o fermentado por si só constituiu a amostra a ser analisada e a temperatura de análise que foi de 25°C. Também foram retiradas amostras para determinação da xantana bruta produzida, conforme metodologia descrita na Seção 4.5, bem como para a determinação da sacarose consumida, conforme metodologia descrita na seção 4.9.1.

Para cada par tempo *versus* temperatura, foi preparado um frasco Erlenmeyer de 1 litro contendo 400 ml de caldo fermentado. A temperatura de 90°C foi aplicada à amostra submergindo o frasco Erlenmeyer contendo a amostra num banho de água termostatizado e as demais temperaturas foram aplicadas à amostra inserindo o frasco Erlenmeyer contendo a amostra numa autoclave.

Após o tratamento térmico, os frascos foram colocados em banho de gelo para rápido resfriamento e, em seguida, colocados em um banho de água termostatizado a 25°C por 30 minutos. As amostras de fermentado, então, foram submetidas a análise reológica,

conforme metodologia descrita a Seção 4.5 excluindo-se a etapa de preparação da amostra uma vez que o fermentado por si só constituiu a amostra a ser analisada e a temperatura de análise que foi de 25° C.

A goma xantana presente em cada amostra de caldo fermentado submetido às diferentes condições de tratamento térmico foi recuperada conforme metodologia descrita na Seção 4.3 utilizando uma proporção de 1:2 v/v de etanol e foram, por fim, submetidas a análise reológica segundo metodologia da norma API RP 13B-1 conforme descrito na Seção 4.5.

4.7 Ensaio para avaliação de diferentes agentes precipitantes

Avaliou-se o desempenho três agentes precipitantes na recuperação da goma xantana do caldo fermentado: etanol (álcool etílico), 2-propanol (isopropanol) e 2propanona (acetona), todos com mais que pureza maior que 99%. Para o etanol, foram aplicadas as proporções de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 v/v de fermentado para etanol e foram aplicadas as proporções de 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5 e 1:3 v/v de fermentado para a acetona ou isopropanol. O ensaio foi realizado em triplicata para cada condição agente/proporção, a temperatura ambiente.

O fermentado foi preparado em duas etapas. A primeira etapa consistiu em preparar o inóculo a partir da incubação do conteúdo dois criotubos da linhagem *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 em um frasco Erlenmeyer (250 ml) contendo 50 ml de YM em incubadora rotativa operando a 175 rpm e 28°C por 24 horas. A segunda etapa consistiu em preparar o fermentado rico em goma xantana a partir do repique de 10 ml da cultura fresca do inóculo em cada um de cinco frascos Erlenmeyer (250 ml) contendo 100 ml de meio para produção de goma conforme definido na seção 4.1.2. Estes frascos foram incubados em uma incubadora rotativa operando a 175 rpm e 28°C por 72 horas.

Em todas as etapas, os frascos contendo o meio de cultivo foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave e a inoculação dos frascos foi realizada com o auxílio de pipetas graduadas previamente esterilizadas e um pipetador automático numa sala de inoculação sob a chama do bico de Bunsen.

Ao final de 72 horas, o conteúdo dos 5 frascos, totalizando 550 ml de caldo fermentado, foi vertido em um frasco Erlenmeyer de 1 litro e submetido a tratamento

térmico a 121°C por 10 minutos para inativação celular. Após esta etapa, o fermentado foi resfriado em banho de gelo.

Amostras de 10 ml de fermentado foram coletadas em beckers de 50 ml com pipeta volumétrica. Entretanto, uma vez que o fermentado é demasiadamente viscoso, em média, 10% do coletado fica aderido nas paredes da pipeta. Por isso, fez-se a pesagem do becker antes e após a adição do fermentado de modo a se determinar a massa exata da amostra.

A densidade foi estimada por 3 coletas de amostra com 3 pipetas volumétricas limpas. As pipetas foram pesadas antes e após amosrtagem e os beckers, onde foram coletadas as amostras, foram pesados antes e após coleta. A soma da massa de fermentado presente na pipeta e no Becker constituem, com maior precisão, a massa equivalente ao volume de 10 ml da pipeta volumétrica. A quantificação da concentração em g/l de xantana, portanto, foi feita com base no peso de amostra de fermentado coletada e da densidade assim determinada.

A adição do precipitante foi feita com o auxílio de uma pipeta volumétrica e a mistura fermentado/agente precipitante foi agitada com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, a mistura contendo a goma precipitada foi filtrada a vácuo e secada em estufa conforme descrito na Seção 4.3.

4.8 Métodos Analíticos

4.8.1 Determinação de sacarose

4.8.1.1 Quantificação por determinação de açúcares redutores

A quantificação do conteúdo de sacarose no fermentado foi determinada pelo método DNS (Miller, 1959). Este é um método colorimétrico onde a concentração dos açúcares redutores após a reação com o DNS (ácido dinitrosalicílico) é proporcional a absorbância no espectro visível a $\lambda = 540$ nm.

O reagente DNS é preparado dissolvendo-se com aquecimento 5 gramas de ácido 3,5 dinitrosalicílico em 150 ml de água destilada e 200 ml de solução de NaOH 1N. Após dissolução, são adicionados 150 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado. O volume é ajustado para 500 ml em balão volumétrico. O reagente é colocado em frasco envolvido com papel alumínio para proteção contra a luz e estocado em geladeira.

O método consiste em reagir a amostra contendo os açúcares redutores com o reagente DNS em banho-maria (aproximadamente 100°C) por 5 minutos. A proporção utilizada foi de 1 ml de DNS para 1 ml de amostra adicionados em tubos de ensaio. Após a reação, os tubos são colocados em banho de gelo para resfriamento e diluídos com 10 ml de água destilada para a realização da leitura em espectrofotômetro.

Uma vez que esta metodologia analítica quantifica açúcares redutores totais e a fonte de carbono utilizada foi sacarose, as amostras de mosto e fermentado foram previamente submetidas a uma etapa de hidrólise ácida com HCl. Esta etapa consiste em reagir 2 ml de amostra com 2 ml de HCl 1N em banho-maria (aproximadamente 100°C) por 10 minutos. Em seguida, a mistura é resfriada em banho de gelo e é adicinado 2 ml de NaOH 1N para neutralizar a mistura.

Para se determinar a relação absorbância versus quantidade de açúcar redutor, construiu-se uma curva padrão de massa conhecida de glicose, um açúcar redutor, versus absorbância. De uma solução padrão de glicose de 10 g/l foram feitas diluições para obtenção de soluções de concentração 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 g/l. Amostras de cada uma destas soluções foram submetidas à reação com o reagente DNS conforme descrito anteriormente. Assim, pontos de valores de massa conhecidos de 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 mg versus absorbância foram obtidos e construiu-se a curva padrão.

4.8.1.2 Quantificação por HPLC

As concentrações de sacarose, frutose e glicose das amostras de xantana foram determinadas por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho (HPAEC). Utilizouse um aparelho de cromatografia da Dionex dotado de uma coluna de troca aniônica (Carboac PA-1) e detector de pulso amperiométrico. O eluente utilizado foi hidróxido de sódio 100 mM com fluxo de 1,0 ml/min.

As soluções para análise no cromatógrafo foram preparadas diluindo-se uma amostra de xantana na forma de pó em água deionizada em balão volumétrico. A quantidade de xantana diluída variou de acordo com a amostra. A solução foi deixada em repouso na temperatura ambiente por pelo menos 16 horas a fim de garantir total solubilização da amostra. Em seguida, esta solução foi filtrada em filtro Milipore de 22µm

para eliminação das moléculas de xantana e outras impurezas que poderiam entupir a coluna cromatográfica.

4.9 Metodologia para otimização de processo

4.9.1 Planejamento fatorial

Os ensaios de otimização foram baseados em planejamento fatorial de três fatores em dois níveis com configuração estrela e três repetições do ponto central (Barros Neto *et al.*). Este planejamento consiste de 3^2 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 17 ensaios. Os fatores estudados foram: (1) concentração inicial do substrato (sacarose), (2) vazão de ar e (3) temperatura. Os valores estudados de cada fator codificados e não codificados estão apresentados na Tabela 5 e a descrição das condições de cada ensaio do planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 6.

As respostas avaliadas foram: (1) concentração de xantana em g/L no fermentado após 48 horas de fermentação (X_{48h}), (2) rendimento em xantana calculado como $R = 100 \cdot (X_{48h}/S_{0h})$ em que S_{0h} é a concentração de sacarose na hora zero de cada batelada em g/L e (3) o parâmetro reológico índice de consistência, *k* em mPa.sⁿ. O índice de comportamento de fluxo, *n*, não foi avaliado pois sua variabilidade é muito pequena.

As fermentações referentes a cada ensaio do planejamento foram realizadas por bateladas repetidas em ciclos de três a seis bateladas por bloco. A ordem de execução dos ensaios foi obtida por aleatorização no programa Statistica 6.0 e os cálculos das variáveis estatísticas associadas aos resultados obtidos no planejamento para cada linhagem foram realizados no programa Statistica 6.0.

	Fatores				
 Nível Codificado	Temperatura (°C)	Vazão de ar (vvm)	Concentração de sacarose (g/L)		
-1,68	23	0,2	16,6		
-1	25	0,5	20,0		
0	28	1,0	25,0		
1	31	1,5	30,0		
1,68	33	1,8	33,4		

TABELA 5 - DEFINIÇÃO E NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS

	Fatores							
Ensaio		Codificados		Decodificados				
	Concentração de Sacarose	Vazão de ar	Temperatura	Concentração de Sacarose (g/L)	Vazão de ar (vvm)	Temperatura (°C)		
1	-1	-1	-1	20	0,5	25		
2	1	-1	-1	30	0,5	25		
3	-1	1	-1	20	1,5	25		
4	1	1	-1	30	1,5	25		
5	-1	-1	1	20	0,5	31		
6	1	-1	1	30	0,5	31		
7	-1	1	1	20	1,5	31		
8	1	1	1	30	1,5	31		
9	-1,68	0	0	17	1,0	28		
10	1,68	0	0	33	1,0	28		
11	0	-1,68	0	25	0,2	28		
12	0	1,68	0	25	1,8	28		
13	0	0	-1,68	25	1,0	23		
14	0	0	1,68	25	1,0	33		
15	0	0	0	25	1,0	28		
16	0	0	0	25	1,0	28		
17	0	0	0	25	1,0	28		

TABELA 6 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: 8 PONTOS FATORIAIS, 6 PONTOS AXIAIS E 3 REPETIÇÕES DO PONTO CENTRAL

Os ensaios do planejamento foram feitos numa seqüência obtida por aleatorização no programa Statistica 6.0 que está apresentada na Tabela 7. As variáveis foram distribuídas da seguinte forma: a variável A como o fator temperatura, a variável B como o fator aeração e variável C como o fator concentração inicial de sacarose.

4.9.2 Análise por meio de superfícies de resposta

Os dados obtidos experimentalmente em ensaios planejados por meio do planejamento fatorial permitem a geração de um modelo empírico que relaciona uma resposta (variável dependente) aos fatores estudados (variável independente). O modelo gerado é submetido a uma análise de significância estatística e de ajuste aos dados experimentais. Havendo significância estatística e ajuste adequado, pode-se construir as superfícies de resposta e curvas de contorno para se determinar como a resposta varia em
função dos fatores e, assim, determinar os níveis dos fatores que conduzem a resposta ótima desejada.

A análise de significância estatística dos efeitos, do modelo e de ajuste do modelo foi realizada pelo teste F, sendo que este último foi feito com base no erro puro associado às repetições do ponto central. Para o cálculo dos efeitos considerou-se inicialmente o modelo completo de 10 parâmetros que inclui o efeito principal, o efeito linear e quadrático de cada variável individualmente e o efeito combinado de cada par de variáveis:

 $y = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + b_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + b_{11} \cdot x_1^{\ 2} + b_{22} \cdot x_2^{\ 2} + b_{33} \cdot x_3^{\ 2}$

Havendo efeitos não significativos, estes foram desconsiderados e um novo modelo considerando somente os efeitos significativos foi submetido à análise de variância.

Ordem de	RANDOM								
Execução dos	2**(3) cent	ral composite, nc=8 ns=	6 nc0=2 ns0=1 Runs	=17					
Ensaios	Ordem do Planejamento	A (Temperatura)	B (Aeração)	C (Sacarose)					
1	10 (C)	0	0	0					
2	6	-1	-1	1					
3	17 (C)	0	0	0					
4	12	1,68179	0	0					
5	11	-1,6818	0	0					
6	1	-1	-1	-1					
7	4	1	1	-1					
8	14	0	1,68179	0					
9	3	1	-1	1					
10	2	-1	1	1					
11	15	0	0	-1,6818					
12	8	1	-1	-1					
13	7	-1	1	-1					
14	16	0	0	1,68179					
15	5 (C)	0	0	0					
16	9	1	1	1					
17	13	0	-1,6818	0					

 TABELA 7 - ORDEM DE EXECUÇÃO DOS ENSAIOS

4.9.3 Função desejabilidade

A metodologia de planejamento fatorial com análise por meio de superfícies de resposta utiliza o ajuste dos dados experimentais a um modelo quadrático para se buscar em que faixa de valor dos fatores estudados uma resposta específica do processo é ótima. O modelo quadrático inclui os efeitos linear e quadrático e os efeitos de interação de primeira ordem entre os fatores. O ajuste deste modelo é feito separadamente para cada resposta ou variável do processo.

No desenvolvimento de um produto ou processo, existe a necessidade de selecionar condições de processo que irão resultar num produto ou processo com as qualidades desejadas. No caso de um processo para produção de xantana, deseja-se obter uma goma com alto índice de consistência e alta pseudoplasticidade (n<<0,5) e um processo com alto rendimento e produtividade.

Em geral, muitas repostas Y_i são importantes e nem sempre as condições de processo que são ótimas para uma resposta Y_1 são ótimas para as demais respostas Y_2 , ..., Y_k . Derringer e Suich (1980) propuseram uma metodologia de otimização simultânea de um conjunto de resposta Y_i que dependem de um conjunto de variáveis independentes X_i (fatores). Esta abordagem é baseada no conceito da função desejabilidade, inicialmente proposta por Harrington (1965, *apud* Derringer and Suich, 1980).

Inicialmente, atribui-se a cada resposta Y_i uma função desejabilidade d_i que caracteriza a resposta com uma pontuação que varia de 0 (muito indesejável) até 1 (muito desejável). A função desejabilidade desenvolvida por Derringer e Suich (1980) tem a seguinte forma para o caso de maximização ou minimização de uma resposta:

$$d_{i} = \begin{cases} 0 & \hat{Y}_{i} \leq Y_{i*} \\ \left[\frac{\hat{Y}_{i} - Y_{i*}}{Y_{i}^{*} - \hat{Y}_{i*}} \right]^{r} & Y_{i*} \leq \hat{Y}_{i} \leq Y_{i*} \\ 1 & \hat{Y}_{i} \geq Y_{i}^{*} \end{cases}$$

em que \hat{Y}_i é p valor do estimador da resposta Y_i obtido por técnicas de regressão dos dados do processo a uma modelo tipicamente polinomial, Y_{i*} é o valor mínimo aceitável para o estimador \hat{Y}_i , Y_i^* é o valor máximo desejado para o estimador \hat{Y}_i e *r* um parâmetro que é escolhido pelo usuário para regular a função desejabilidade em função do quão crítico é para o processo a variável estar mais longe ou mais próxima de seu valor ótimo.

Quando se tem uma resposta com restrição de máximo e mínimo de valor e o ótimo da resposta está entre estes valores toleráveis, a função desejabilidade pode ser descrita da seguinte forma:.

$$d_{i} = \begin{cases} \left[\frac{\hat{Y}_{i} - Y_{i*}}{c_{i} - Y_{i*}}\right]^{s} & Y_{i*} \leq \hat{Y}_{i} \leq c_{i} \\ \left[\frac{\hat{Y}_{i} - Y_{i}^{*}}{c_{i} - Y_{i}^{*}}\right]^{t} & c_{i} \leq \hat{Y}_{i} \leq Y_{i}^{*} \\ 0 & \hat{Y}_{i} \geq Y_{i*} \text{ ou } \hat{Y}_{i} \geq Y_{i}^{*} \end{cases} \end{cases}$$

em que \hat{Y}_i é o valor do estimador da resposta Y_i obtido por técnicas de regressão dos dados do processo a uma modelo tipicamente polinomial, Y_{i*} é o valor mínimo aceitável para o estimador \hat{Y}_i , Y_i^* é o valor máximo aceitável para o estimador \hat{Y}_i , c_i é o valor altamente desejável e *s* e *t* são parâmetros que são escolhidos pelo usuário para regular a função desejabilidade em função do quão crítico é para o processo a variável estar mais longe ou mais próxima de seu valor ótimo c_i. A Figura 14 ilustra como a função desejabilidade varia com *r*, no caso de maximização ou minimização de uma resposta, ou *s* e *t*, no caso de um valor crítico de uma resposta, dentro das restrições impostas.



FIGURA 14 - PERFIL DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE (DERRINGER AND SUICH, 1980)

Uma vez determinadas as restrições da função desejabilidade d_i para cada resposta Y_i, pode-se determinar desejabilidade global D do processo. A desejabilidade global é a média geométrica da função desejabilidade d_i de cada resposta para uma dada condição de valores dos fatores estudados: $D = (d_1 \cdot d_2 \cdot ... \cdot d_k)^{1/k}$. Com esta abordagem, a

otimização de múltiplas respostas torna-se a otimização de uma única resposta que é a desejabilidade global. A função objetivo é maximizar D e se determinar quais os valores de X_i que irão maximizar o valor de D, *i.e.*, aproximá-la da unidade. Isto pode ser conseguido utilizando-se técnicas conhecidas de otimização.

5 Resultados e Discussões

5.1 Avaliação do agente precipitante

Os ensaios de recuperação de goma xantana bruta com três agentes precipitantes etanol, isopropanol e acetona - tiveram como objetivo avaliar qual deles apresentava melhor rendimento considerando, paralelamente, o custo e as exigências técnicas para o seu uso industrial. Foram avaliadas proporções menores para a acetona e o isopropanol, pois alguns trabalhos publicados indicam melhor rendimento de xantana com estes agentes. Além disso, economicamente, uma proporção maior destes dois agentes não seria interessante quando comparado com o etanol, cujo preço e disponibilidade o tornam mais atraente para uso em escala industrial. A Figura 15 mostra a massa de xantana bruta recuperada por litro de fermentado em função da natureza e proporção de agente precipitante.



FIGURA 15 - XANTANA BRUTA RECUPERADA DO CALDO FERMENTADO EM FUNÇÃO DA NATUREZA E PROPORÇÃO DO AGENTE PRECIPITANTE

A acetona apresenta maior rendimento na recuperação da goma quando comparada ao etanol e ao isopropanol. Na proporção de 1:1 para fermentado, esta tendência é ainda mais acentuada devido ao fato de esta substância apresentar constante dielétrica muito inferior a da água abaixando consideravelmente a polaridade do meio e, conseqüentemente, diminuindo a solubilidade de macromoléculas orgânicas, como a xantana. O principio da precipitação com solvente orgânico reside na redução da constante dielétrica do meio aquoso e esta redução faz com que as interações carga-dipolo e dipolo-dipolo fiquem mais evidentes entre solutos não puramente iônicos, como diversas proteínas e polissacarídeos, que acabam por se atrair e precipitar (Blanch e Clark, 1996). O etanol e o isopropanol por apresentarem constante dielétrica maior que a acetona e mais próxima à da água, necessitam de maior quantidade para efetuar eficientemente a precipitação da goma.

Considerando como 100% de recuperação da goma xantana bruta a quantidade precipitada com 3 volumes de acetona, foram calculadas a percentagens de recuperação relativa para cada agente precipitante e proporção utilizada. A Figura 16 apresenta o resultado do ensaio de precipitação em termos percentuais. O etanol, na proporção de 1:5, precipitou 90% da xantana bruta relativamente à quantidade precipitada com 1:3 de acetona. O isopropanol apresentou rendimento aproximadamente 30% superior ao etanol nas proporções de 1:1 e 1:2, esta diferença diminui para aproximadamente 10% na proporção de 1:3.



FIGURA 16 - PERCENTUAL DE GOMA XANTANA BRUTA RECUPERADA EM FUNÇÃO DA NATUREZA E PROPORÇÃO DO AGENTE PRECIPITANTE

Os resultados apresentados na Figura 15 e na Figura 16 demonstram claramente que a acetona é o melhor o agente precipitante pois apresenta melhor rendimento, ou seja,

maior quantidade de xantana recuperada por volume de precipitante. A acetona precipita 87% da xantana bruta na proporção de 1:1,5 em contraste com o etanol que precipita este mesmo percentual na proporção de 1:4. Necessita-se, portanto, de 2,5 vezes mais volume de etanol que acetona para precipitar aproximadamente 90% da xantana bruta.

A escolha para o uso industrial, entretanto, depende do custo de cada solvente e das exigências operacionais. A acetona tem maior valor de mercado, apresenta comercialização sujeita a rigoroso controle governamental, pois é um solvente utilizado no refino da cocaína, e também é uma substância mais inflamável que o etanol, necessitando de maiores investimentos operacionais. Frente a estas considerações, etanol, apesar de necessitar de um maior volume para recuperar a xantana, apresenta-se industrialmente mais interessante que a acetona.

A Figura 17 mostra aspectos do fermentado e da xantana precipitada após adição de etanol e após lavagem com água e reprecipitação com etanol.



FIGURA 17 - ASPECTOS DA PRECIPITAÇÃO DA XANTANA DO FERMENTADO UTILIZANDO ETANOL – (A) FRASCO X4 CALDO FERMENTADO APÓS TRATAMENTO TÉRMICO E BECKER X3 GOMA XANTANA REDILUÍDA APÓS PRECIPITAÇÃO; (B), (C) E (D) GOMA XANTANA REPRECIPITADA COM ETANOL

A Figura 17 (A) mostra a fotografia de uma amostra (X4) de caldo fermentado obtida ao final de uma batelada e de uma amostra (X3) de xantana rediluída em água

destilada após precipitação com etanol. Esta fotografia evidencia a diferença de coloração entre o fermentado e a solução de xantana bruta rediluída em que o pigmento amarelo das células já não está mais presente. A Figura 17 (B) mostra a fotografia da amostra (X3) após lavagem e reprecipitação com etanol. Nesta fotografia, observa-se o aspecto fibroso da fração flotada e uma segunda fração no fundo do Becker. As Figura 17 (C) e (D) mostram outras fotografias da amostra (X3) precipitada evidenciando o aspecto de algodão molhado da goma precipitada.

Como a goma xantana é um polissacarídeo de alto peso molecular, a abrupta redução da solubilidade com a adição do precipitante faz com que suas moléculas se unam rapidamente formando um aglomerado das fitas poliméricas criando, em seu interior, microambientes que aprisionam parte da mistura etanol-água contendo restos celulares, incluindo proteínas, RNA, lipídios e polissacarídeos do envoltório celular, e até mesmo solutos do meio, como a sacarose.

Por este motivo, algumas amostras de xantana bruta foram analisadas quanto ao seu conteúdo de sacarose. As amostras analisadas foram as amostras obtidas ao final de 48h de fermentação de cada uma das 17 bateladas do planejamento experimental da linhagem *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 e precipitadas com etanol na proporção 5:1 de fermentado conforme descrito na seção 4.3. A Tabela 8 mostra o conteúdo de sacarose das amostras de xantana determinado por HPLC.

Batelada	Sacarose no mosto	Sacarose Residual no fermentado	Xantana bruta	Conteúdo de xantana	sacarose na 1 bruta
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/kg)	%
1	25	14	11,0	65,8	6,6
2	31	22	7,7	40,1	4,0
3	27	14	8,8	36,7	3,7
4	26	13	14,3	98,6	9,9
5	26	9	9,5	16,7	1,7
6	21	6	11,4	25,7	2,6
7	21	9	14,6	49,0	4,9
8	25	14	12,1	24,0	2,4
9	29	22	9,3	20,3	2,0
10	29	22	10,8	26,0	2,6
11	18	9	9,2	15,5	1,5
12	21	11	10,3	41,7	4,2
13	21	14	9,7	36,6	3,7
14	33	22	9,9	56,6	5,7
15	25	13	12,5	44,7	4,5
16	31	17	11,7	59,3	5,9
17	26	13	11,3	41,8	4,2

TABELA 8 - TEOR DE SACAROSE EM AMOSTRAS DE XANTANA RECUPERADA COM ETANOL

A Figura 18 mostra o teor de sacarose na xantana bruta em função da concentração de sacarose residual no fermentado e também em função da razão entre a concentração de sacarose residual no fermentado (g/l) e a quantidade de xantana bruta recuperada do fermentado (g/l).



FIGURA 18 - TEOR DE SACAROSE NA XANTANA BRUTA - (A) EM FUNÇÃO DA SACAROSE RESIDUAL NO FERMENTADO E (B) EM FUNÇÃO DA RAZÃO DA MASSA SACAROSE RESIDUAL NO FERMENTADO POR MASSA DE XANTANA RECUPERADA DO CALDO

A simples visualização da dispersão dos valores não sugere nenhuma correlação entre as varáveis. A

Tabela 9 mostra a estatística descritiva e a Figura 19 mostra o histograma e o normal p-Plot dos valores do conteúdo de sacarose na xantana bruta (%p/p).

TABELA 9 - ESTATISTICA DESCRITIVA DOS VALORES PERCENTUAIS (P/P) DE SACAROSE NA XANTANA BRUTA

N	\overline{x}	Intervalo de confiança 95%		X _{min}	x _{max}	s ²	S	Erro padrão
17	4,11	3,03	5,19	1,55	9,861	0,0440	2,099	0,509



FIGURA 19 - HISTOGRAMA E NORMAL P-PLOT PARA OS DADOS DO PERCENTUAL DE SACAROSE NA XANTANA BRUTA

Embora a distribuição dos dados mostrada no histograma e no Normal p-Plot evidencie certo desvio da normalidade, segundo o teste de Shapiro-Wilk, pode-se afirmar que os dados seguem uma distribuição normal (p>0,05). A média da quantidade de sacarose na xantana bruta foi de 4,11% p/p.

Estes resultados sugerem, portanto, que, conforme suposto, a sacarose residual do fermentado tende a precipitar juntamente com a xantana quando precipitada com etanol e que este percentual de sacarose não apresenta correlação com a quantidade de xantana precipitada e tampouco com a quantidade de sacarose residual. Considerando que os valores seguem uma distribuição normal, a variabilidade pode ser atribuída a pequenos desvios aleatórios que ocorrem na etapa da precipitação.

5.2 Determinação da biomassa de *Xanthomonas campestris*

A metodologia para determinação de biomassa de fermentado de *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 a partir da medida da absorbância é citada em diversos trabalhos publicados na literatura, entre eles, García-Ochoa *et al.* (1992, 1999), Casas *et al.* (2000) e Patton and Dugar (1981), Tait (1986), Schweickart (1989), Moraine and Rogovin (1973).

García-Ochoa *et al.* (1992) utiliza esta metodologia fazendo uma curva de calibração com diferentes fermentados a partir da medida da absorbância a 540 nm e determinação da concentração da biomassa por gravimetria (massa seca). Neste trabalho, o pesquisador afirma que não foi observada absorbância pela xantana ou sacarose no comprimento de onda de 540 nm. García-Ochoa (1999) ainda sugere a equação $C_B = 0,2845 \cdot OD_{540nm}$ para determinação da biomassa de *Xanthomonas campestris*, em

que C_B é a concentração de biomassa em g/l e OD540 nm é a densidade ótica do fermentado diluído. O pesquisador, entretanto, não informa qual a diluição aplicada.

Patton and Dugar (1981), em seu trabalho, utilizaram a mesma metodologia exceto pelo comprimento de onda que foi de 600 nm uma vez que, segundo eles, este comprimento de onda foi o que apresentou absorbância mínima do meio de cultivo constituído basicamente de glicose ou sacarose, como fonte de carboidrato, e farelo de semente de algodão, como fonte de nitrogênio. A contribuição da absorbância do meio de cultivo, ainda assim, foi descontada das medidas de absorbância do caldo fermentado. Os autores relatam que a curva de calibração foi construída a partir de amostras de fermentado selecionadas durante os ensaios e, uma vez que uma curva de calibração confiável foi obtida, não mais foram realizadas determinações gravimétricas da biomassa.

Ashraf *et al.* (1996) propuseram a construção de uma curva de calibração para determinação a biomassa de *Xanthomonas campestris* por medida da absorbância em que a contribuição da absorbância da goma é descontada da absorbância do fermentado, uma vez que esta última medida é afetada pela presença das células e da goma.

Finalmente, Begot *et al.* (1996), enfatizou que, na determinação de biomassa por densidade ótica, a curva de calibração além de ser específica para um gênero e espécie é também específica para o aparelho utilizado na realização das leituras, pois a faixa de linearidade da curva depende da sensibilidade do aparelho.

Frente a estas informações acerca da metodologia, que inclusive é trivial na engenharia bioquímica, fez-se necessário reavaliar a contribuição do meio de cultivo, da concentração de xantana e da diluição do fermentado na determinação da biomassa por turbidimetria. Os cinco ensaios realizados, portanto, tiveram como objetivo obter uma curva de calibração confiável levando-se em consideração a contribuição destas variáveis e também a sensibilidade do espectrofotômetro.

5.2.1 Cinética de crescimento

Os Ensaios 1, 2, 3 e 5 forneceram informações acerca da cinética de crescimento da *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 em função do tempo e quantidade de inóculo adicionada e o Ensaio 4 forneceu informação acerca da influência da diluição do caldo na absorbância. A Figura 20 apresenta o resultado dos Ensaios 1,2,3 e 5.



FIGURA 20 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO (A - ENSAIO 1), VOLUME DE INÓCULO (B - ENSAIO 2), VOLUME DE INÓCULO E TEMPO DE INCUBAÇÃO (C - ENSAIO 3) E TEMPO DE INCUBAÇÃO (D - ENSAIO 5).

O perfil de crescimento celular obtido pelo Ensaio 1 (Figura 20 (A)) mostra que, nas condições de propagação aplicadas, o tempo de 20 horas de incubação não foi suficiente para se atingir a fase estacionária de crescimento. Os dados experimentais da fase exponencial de crescimento foram ajustados uma curva exponencial em que a taxa de crescimento microbiano é proporcional à concentração celular:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X$$
 que integrando, resulta em $X = X_0 \cdot e^{\mu_x \cdot t}$

em que X é a concentração de biomassa (g/l) no tempo t, X_0 é a concentração de biomassa (g/l) no tempo t₀, t é o tempo (h) e μ_x é a velocidade específica de crescimento (h⁻¹).

O ajuste dos dados a curva retornou os seguintes valores: $X_0 = 0,30$ g/l e $\mu_x = 0,076$ h⁻¹. O coeficiente de determinação ou explicação do modelo (R²) foi de 0,988, o que indica um bom ajuste dos dados experimentais á curva evidenciando a fase de crescimento

exponencial. A concentração de biomassa inicial X_0 obtida pela regressão apresenta valor alto ao se observar os valores obtidos ao final da fermentação nos cinco ensaios conforme apresentados na Tabela 10. Se o caldo fermentado obtido nestes 5 ensaios fossem considerados como a cultura fresca que foi utilizada no presente trabalho como inóculo numa porção de 10 ml para 100 ml de mosto, a massa inicial (X_0) assumiria valores de 0,10 a 0,25 g/l.

Ensaio	Tempo de incubação (h)	Volume de inóculo (ml)	Concentração de biomassa (g/l)
1	20	10	1,38
2	20	10	1,29
3	68	10	2,15
4	20	10	1,19
5	72	10	2,77

TABELA 10 - CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA MÁXIMA OBTIDA EM CADA UM DOS CINCO ENSAIOS

A influência do volume inicial do inóculo na concentração de biomassa ao final de 20 horas ficou evidente quando se compara os volumes de 0,1 ml, 1 ml e 10 ml na Figura 20(B). A concentração final de biomassa obtida com 10 ml de inóculo tem valor próximo ao obtido pelo Ensaio 1 nas mesmas condições de ensaio conforme mostrado na Tabela 10.

Confirmando a tendência de continuidade do crescimento exponencial observada no Ensaio 1, valores maiores de concentração de biomassa foram obtidos nos Ensaios 3 e 5, ou seja, 2,15 g/l em 68 horas e 2,77 g/l em 72 horas de incubação. O perfil de crescimento obtido no Ensaio 5 ajustou-se bem a uma curva polinomial de 3ª ordem evidenciando uma inflexão a partir da qual a taxa de crescimento celular torna-se menor que a taxa de morte celular até que estas taxa se igualam na fase estacionária. Curva de crescimento similar foi reportada por Amanullah *et al.* (1996) na padronização do inóculo para ensaios em planta piloto. Cabe mencionar que, a julgar pelos procedimentos experimentais aplicados, a causa de qualquer variabilidade significativa do inóculo está relacionada à viabilidade das células e ao volume da suspensão celular contida nos criotubos utilizados no pré-inóculo.

5.2.2 Absorbância do fermentado

Em todos os ensaios, foram feitas medidas de absorbância do fermentado diluído em várias proporções nos comprimentos de onda de 540 nm e 600 nm. O resultado global destes ensaios forneceu informações importantes sobre a relação da concentração de biomassa no fermentado com a absorbância, com a diluição e, também, com a concentração de xantana no fermentado que foi quantificada somente nos ensaios 3, 4 e 5.

A Figura 21 apresenta o perfil da variação da Absorbância a 540 nm e 600 nm em função da concentração de biomassa proveniente de uma única amostra de fermentado diluído seqüencialmente de 1 a 30 vezes (Ensaio 4). Os valores das abscissas nos gráficos da Figura 21 são os valores correspondentes à concentração de biomassa estabelecida após a diluição do fermentado, *i.e.*, o valor médio da concentração de biomassa no fermentado dividido pela diluição aplicada.



FIGURA 21 - ABSORBÂNCIA A 540 NM E 600 NM EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

Observa-se na Figura 21 que, apesar de o ajuste linear resultar em um coeficiente de determinação do modelo (R²) de aproximadamente 0,98 para os dois perfis indicando uma forte correlação linear entre as variáveis, há um suave desvio desta linearidade a partir de valores de absorbância acima de 0,5-0,6. Este desvio é esperado uma vez que é inerente à sensibilidade do espectrofotômetro. Por este motivo, todos os modelos apresentados para relacionar a concentração de biomassa às variáveis absorbância, diluição e concentração de xantana foram ajustados nesta região de linearidade, i.e., somente foram utilizados para os cálculos os dados em que o valor da absorbância não ultrapassou o limite máximo de 0,6.

As Figura 22, Figura 23, Figura 24 e Figura 25 apresentam o perfil da concentração de biomassa (valores reais corrigidos pela diluição aplicada) em função a absorbância obtidos nos ensaios 1, 2, 3 e 5 respectivamente.



FIGURA 22 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 540 NM E 600 NM (ENSAIO 1)



FIGURA 23 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 540 NM E 600 NM (ENSAIO 2)



FIGURA 24 - CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA A 540 NM E 600 NM (ENSAIO 3)





Observa-se nas Figuras Figura 22, Figura 23, Figura 24 e Figura 25 que houve certa variação na inclinação das retas de regressão e que os valores do intercepto das retas de regressão apresentaram valor negativo que podem ser explicados pela influência do meio de cultivo e da presença de xantana no fermentado. A contribuição do meio de cultivo YM foi considerada desprezível, com um valor médio de 0,011. Por isso, as leituras no espectrofotômetro foram comparadas a um branco de água destilada, *i.e.*, o valor de zero absorbância foi tomado como sendo o da água destilada. A contribuição da xantana na absorbância do fermentado diluído é considerada relevante conforme será apresentado mais adiante. O valor negativo do intercepto, portanto, reflete a influência não computada da xantana e do meio de cultivo.

A Tabela 11 apresenta uma estatística descritiva dos resultados obtidos, o valor médio dos parâmetros de regressão do modelo linear y=ax+b obtidos nos cinco ensaios e o teste probabilidade baseado na distribuição t de Student para este modelo baseado na média dos parâmetros.

Os valores médios dos parâmetros a e b da curva de calibração apresentados na Tabela 11 são estatisticamente significativos uma vez que a probabilidade de o valor da variável *t* de Student tabelado ser maior que o valor calculado não ultrapassa 5%. Este valor significa que o valor médio dos parâmetros representa uma estimativa do valor real com 95% de confiança. Uma abordagem considerando os valores de concentração de biomassa diluída (X/d) em função da absorbância do fermentado diluído a 540 nm que foram obtidos em todos os ensaios está apresentada na Figura 26.

	Absorbância a 540 nm											
			Ensaio	nsaio			~	t _{calc}	Р			
	1	2	3	4	5	X	S	x/(s√N)	$ \mathbf{t}_{\mathrm{Tab}} > \mathbf{t}_{\mathrm{calc}}$			
a	0,428	0,422	0,485	0,392	0,405	0,427	0,0356	26,81	0,0012%			
b	-0,0188	-0,0213	-0,0227	-0,0100	-0,0150	-0,0176	0,00513	7,65	0,157%			
\mathbf{R}^2	0,981	0,984	0,983	0,999	0,979	0,985		N=5	v=4			
				Absor	bância a 60	0 nm						
			Ensaio				G	t _{calc}	Р			
	1	2	3	4	5	X	8	x/(s√N)	$ \mathbf{t}_{\mathrm{Tab}} > \mathbf{t}_{\mathrm{calc}}$			
a	0,537	0,494	0,561	0,462	0,483	0,507	0,0407	27,85	0,001%			
b	-0,0276	-0,0243	-0,021	-0,011	-0,016	-0,020	0,00638	7,04	0,214%			
\mathbf{R}^2	0,976	0,986	0,981	0,999	0,972	0,983		N=5	v=4			

TABELA 11 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E TESTE T DE STUDENT PARA O MODELO y=a.ABS+b

x é a média amostral, s é o desvio padrão da média amostral, N é o número de graus de liberdade da média amostral, t_{Tab} é o valor da variável *t* de student tabelado correspondente a 95% de confiança, N é o número de amostras e v é o numero de graus de liberdade associado ao calculo das médias.



FIGURA 26 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DILUÍDA (X/D) EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA DO FERMENTADO DILUÍDO A 540 NM

O valor dos parâmetros da correlação linear que considera todos os pontos (X/d) *versus* ABS_{540nm} estão bem próximos das médias dos parâmetros individuais dos cinco ensaios apresentados na Tabela 9. Observa-se também que os dados obtidos no Ensaio 3 apresentam desvio mais acentuado da reta de regressão. As correlações (X/d) *versus* ABS

do fermentado diluído, no entanto, não levam em consideração a concentração de xantana no fermentado.

Para quantificar a influência da xantana na medida da absorbância do fermentado, foi construída uma curva de calibração de absorbância versus concentração de xantana de soluções aquosas. A Figura 27 apresenta os valores de absorbância nos comprimentos de onda de 540 nm e 600 nm de soluções aquosas de xantana grau alimentício em várias concentrações.



FIGURA 27 - ABSORBÂNCIA DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE XANTANA A 540 NM E 600 NM

A reta de regressão foi forçada a passar pelo ponto zero uma vez que o branco na leitura da absorbância foi água destilada. De fato, em concentração zero de xantana a absorbância medida deve ser a mesma da água destilada. Os coeficientes de determinação dos modelos foram superiores a 0,99 indicando forte correlação linear entre as variáveis. A inclinação das retas mostra que a absorbância da xantana no comprimento de onda de 540 nm tende a ser maior que em 600 nm na medida em que a sua concentração de xantana aumenta. Quando não se tem os valores da concentração de xantana no fermentado, portanto, é recomendável fazer a leitura da absorbância do fermentado a 600 nm minimizando a interferência da xantana na medida.

Com esta informação quantitativa da contribuição da xantana, pode-se descontar o valor de absorbância oriundo da interferência da xantana dos valores de absorbância

medidos para o fermentado. Esta é abordagem mais simples que se pode fazer da relação entre as variáveis concentração de biomassa, absorbância, concentração de xantana e diluição. Matematicamente, pode ser escrita como uma relação linear de duas variáveis:

$$\mathbf{y} = \mathbf{m} \mathbf{x} + \mathbf{b}$$

onde (X/d) = m . $\Delta ABS + \mathbf{b}$

em que X é a concentração de biomassa em g/l, d é a diluição aplicada, $\Delta ABS =$ (ABSFerm – ABSXant), ABS_{Ferm} é a medida de absorbância do fermentado diluído e ABS_{Xant} é o valor teórico da contribuição da xantana na absorbância do fermentado calculada a partir do coeficiente angular da reta da Figura 18 e da concentração de xantana em g/l (P) no fermentado diluído: ABS_{xant} = m_{xant} P.

Outra abordagem seria o ajuste multivariável em que a concentração de biomassa do fermentado sem estar diluído poderia ser obtida diretamente de um modelo linear multivariável. Matematicamente, esta relação linear poderia ser escrita da seguinte forma:

$$y = m_1 x_1 + m_2 x_2 + \dots + m_k x_k + b$$

Em que y é a variável dependente, $x_1, x_2, ..., x_k$ são as variáveis independentes, m1, m₂, ..., m_k são os coeficientes angulares e b o coeficiente linear.

Os dados dos ensaios 3, 4 e 5 forneceram dados para avaliar as correlações entre as variáveis. Nos ensaios 3 e 4, foram quantificados os valores de xantana bruta e no ensaio 5 também foi quantificada a xantana pura. A Tabela 12 mostra os dados obtidos no Ensaio 3 em ordem de diluição e ensaio.

				540 nm			
Amostra	X	X / d	ABS _{Ferm}	d	Р	P/d	ABS _{ferm} - ABS _{xant}
A - 5	0,837	0,167	0,389	5	7,35	1,47	0,814
B - 5	0,939	0,188	0,414	5	7,30	1,46	0,835
C - 5	1,072	0,214	0,451	5	8,10	1,62	0,839
D - 5	2,071	0,414	0,894	5	9,73	1,95	0,687
E - 5	2,154	0,431	0,896	5	10,76	2,15	0,668
A - 10	0,837	0,084	0,222	10	7,35	0,73	0,907
B - 10	0,939	0,094	0,235	10	7,30	0,73	0,918
C - 10	1,072	0,107	0,253	10	8,10	0,81	0,920
D - 10	2,071	0,207	0,503	10	9,73	0,97	0,950
E - 10	2,154	0,215	0,504	10	10,76	1,08	0,947
A - 20	0,837	0,042	0,138	20	7,35	0,37	0,953
В - 20	0,939	0,047	0,146	20	7,30	0,36	0,959
C - 20	1,072	0,054	0,154	20	8,10	0,41	0,960
D - 20	2,071	0,104	0,274	20	9,73	0,49	0,975
E - 20	2,154	0,108	0,287	20	10,76	0,54	0,973
				600 nm			
Amostra	X	X / d	ABS _{Ferm}	d	Р	P/d	ABS _{ferm} - ABS _{xant}
A - 5	0,837	0,167	0,129	5	7,35	1,47	0,204
B - 5	0,939	0,188	0,128	5	7,30	1,46	0,222
C - 5	1,072	0,214	0,142	5	8,10	1,62	0,246
D - 5	2,07	0,414	0,811	5	9,73	1,95	0,64
E - 5	2,15	0,431	0,793	5	10,76	2,15	0,60
A - 10	0,837	0,084	0,065	10	7,35	0,73	0,124
B - 10	0,939	0,094	0,064	10	7,30	0,73	0,136
C - 10	1,072	0,107	0,071	10	8,10	0,81	0,145
D - 10	2,071	0,207	0,085	10	9,73	0,97	0,355
E - 10	2,154	0,215	0,094	10	10,76	1,08	0,333
A - 20	0,837	0,042	0,032	20	7,35	0,37	0,086
В - 20	0,939	0,047	0,032	20	7,30	0,36	0,094
C - 20	1,072	0,054	0,036	20	8,10	0,41	0,095
D - 20	2,071	0,104	0,043	20	9,73	0,49	0,191
E - 20	2.154	0.108	0.047	20	10.76	0.54	0.187

 TABELA 12 - DADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 3

A, B, C D e D referem-se Às condições de volume de inóculo / tempo de fermentação de (2,5 ml / 44 h), (5 ml / 44 h), (10 ml / 44 h), (5 ml / 66 h) e (10 ml / 66 h) respectivamente.

Os dados das amostras D-5 e E-5 foram desconsiderados para os cálculos dos parâmetros dos modelos obtidos por regressão linear propostos pois os valores de absorbância são maiores que 0,6. A Tabela 13 apresenta os modelos propostos e a Tabela 14 o resultado dos ajustes aos modelos.

	Madala	Variáveis						
Modelo		У	x ₁	X ₂	X ₃			
1	$y = m_1 x_1 + b$	X/d	ABS _{ferm}	-	-			
2	$y = m_1 x_1 + b$	X/d	ΔABS	-	-			
3	$y = m_1 x_1 + m_2 x_2 + b$	Х	ABS _{ferm}	d				
4	$y = m_1 x_1 + m_2 x_2 + m_3 x_3 + b$	Х	Р	ABS _{ferm}	d			

TABELA 13 - MODELOS PROPOSTOS PARA AJUSTE DOS DADOS DO ENSAIO 3

TABELA 14 - PARÂMETROS DOS MODELOS PROPOSTOS PARA AJUSTE DOS DADOS DO ENSAIO 3

				540 nm	l				
M. J.L.	Coe	ficientes de	Regressão	1	V	Variáveis Estatísticas			
Niodelo	b	m1	m2	m3	\mathbf{R}^2	F	$P(F_{tab} > F_{calc})$		
1	-0,0227	0,4850	-	-	0,983	-	-		
2	-0,00379	0,6002	-	-	0,842	-	-		
3	-1,524	5,208	0,0978	-	0,841	26,42	0,01%		
4	-2,114	0,321	1,331	0,025	0,962	76,09	0,00%		
				600 nm	l				
Madala	Coe	ficientes de	Regressão	1	V	Variáveis Estatísticas			
Widdelo	b	m1	m2	m3	R2	F	P (Ftab>Fcalc)		
1	-0,0208	0,5612	-	-	0,981	-	-		
2	-0,00302	0,6905	-	-	0,852	-	-		
3	-1,498	6,002	0,0978	-	0,826	23,68	0,02%		
4	-2,125	0,323	1,543	0,025	0,963	78,83	0,00%		

Os melhores ajuste foram conseguidos com os modelos 1 e 4, o mais simples e o mais complexo respectivamente. O modelo 2, que utilizou como variável independente um valor de absorbância, descontando a contribuição da absorbância da xantana, não apresentou um ajuste satisfatório. O modelo 3, por sua vez, colocou a variável diluição como variável independente correlacionando-a ao valor da biomassa no fermentado não diluído. Esta modelo também não apresentou um ajuste foi satisfatório. A Figura 28 é um gráfico dos valores da concentração de biomassa do fermentado calculados pelo modelo

versus os valores observados experimentalmente que evidencia a dispersão dos valores preditos pelos modelos 2 e 3.



Valores da concentração de biomassa obtidos experimentalmente (g/l)

FIGURA 28 - VALORES PREDITOS VERSUS OBSERVADOS PARA A BIOMASSA OBTIDOS NO ENSAIO 3: (A) Absorbância a 540 nm e (B) absorbância a 600 nm

O Ensaio 4 consistiu da diluição seqüencial de uma mesma amostra de fermentado. A concentração da xantana em cada amostra de fermentado diluído foi reduzida também seqüencialmente de modo que, a abordagem do desconto da xantana na absorbância do fermentado apresentou uma boa correlação como pode ser observado na Figura 29.



FIGURA 29 - DESCONTO DA INFLUÊNCIA DA XANTANA NA MEDIDA DE ABSORBÂNCIA DO FERMENTADO

Indo contra as tendências do Ensaio 3, os dados do Ensaio 5 apresentam bom ajuste quase todos os modelos. A Tabela 15 apresenta os dados obtidos no Ensaio 5 em ordem de ensaio e diluição. Os dados das amostras C-5, D-5 e E-5 obtidos no comprimento de onda de 600 nm e os dados das amostras B-5, C-5, D-5 e E-5 obtidos no comprimento de onda de 540 nm foram desconsiderados para os cálculos dos parâmetros dos modelos por regressão linear propostos uma vez que os valores de absorbância são maiores que 0,6. A Tabela 16 apresenta os modelos propostos e a Tabela 17 o resultado dos ajustes aos modelos.

				54	0 nm			
Amostra	X	X / d	ABS _{Ferm}	d	P _{BRUTO} / d	∆ABS _{bruto}	P _{PURO} / d	∆ ABS _{puro}
A - 5	0,82	0,163	0,472	5	0,886	0,378	0,563	0,412
A - 10	0,82	0,082	0,249	10	0,443	0,202	0,282	0,219
A - 20	0,82	0,041	0,127	20	0,221	0,104	0,141	0,112
B - 5	1,25	0,250	0,683	5	1,322	0,543	0,920	0,586
B - 10	1,25	0,125	0,374	10	0,661	0,303	0,460	0,325
B - 20	1,25	0,062	0,195	20	0,331	0,160	0,230	0,171
C - 5	1,88	0,376	0,883	5	1,656	0,707	1,105	0,766
C - 10	1,88	0,188	0,503	10	0,828	0,415	0,553	0,444
C - 20	1,88	0,094	0,268	20	0,414	0,224	0,276	0,239
D - 5	2,32	0,464	0,983	5	2,012	0,769	1,254	0,850
D -10	2,32	0,232	0,583	10	1,006	0,476	0,627	0,516
D - 20	2,32	0,116	0,313	20	0,503	0,260	0,313	0,280
E - 5	2,77	0,555	1,018	5	2,077	0,797	1,323	0,878
E - 10	2,77	0,277	0,622	10	1,039	0,511	0,661	0,551
E - 20	2,77	0,139	0,347	20	0,519	0,292	0,331	0,312
			60	0 nm				
Amostra	X	X / d	ABS _{Ferm}	d	P _{BRUTO} / d	∆ABS _{bruto}	P _{PURO} / d	AABS _{puro}
A - 5	0,82	0,163	0,402	5	0,886	0,325	0,563	0,353
A - 10	0,82	0,082	0,209	10	0,443	0,170	0,282	0,184
A - 20	0,82	0,041	0,107	20	0,221	0,088	0,141	0,095
B - 5	1,25	0,250	0,583	5	1,322	0,467	0,920	0,502
B - 10	1,25	0,125	0,319	10	0,661	0,261	0,460	0,279
B - 20	1,25	0,062	0,164	20	0,331	0,135	0,230	0,144
C - 5	1,88	0,376	0,793	5	1,656	0,648	1,105	0,696
C - 10	1,88	0,188	0,438	10	0,828	0,365	0,553	0,389
C - 20	1,88	0,094	0,229	20	0,414	0,193	0,276	0,205
D - 5	2,32	0,464	0,896	5	2,012	0,719	1,254	0,786
D -10	2,32	0,232	0,511	10	1,006	0,423	0,627	0,456
D - 20	2,32	0,116	0,269	20	0,503	0,225	0,313	0,241
E - 5	2,77	0,555	0,943	5	2,077	0,761	1,323	0,827
E - 10	2,77	0,277	0,546	10	1,039	0,455	0,661	0,488
F 2 0	2 77	0.130	0.296	20	0.519	0.251	0 331	0.267

TABELA 15 - DADOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 5

A, B, C D e D referem-se às condições de tempo de incubação de 24h, 36h, 48h, 60h e 72h respectivamente.

	Modele		Variáveis						
_	Modelo	У	x ₁	X ₂	X ₃				
1	$\mathbf{y} = \mathbf{m}_1 \mathbf{x}_1 + \mathbf{b}$	X/d	ABS_{ferm}	-	-				
2	$\mathbf{y} = \mathbf{m}_1 \mathbf{x}_1 + \mathbf{b}$	X/d	ΔABS_{BRUTO}	-	-				
3	$\mathbf{y} = \mathbf{m}_1 \mathbf{x}_1 + \mathbf{b}$	X/d	ΔABS_{PURO}						
4	$y = m_1 x_1 + m_2 x_2 + b$	Х	ABS_{ferm}	d					
5	$y = m_1 x_1 + m_2 x_2 + m_3 x_3 + b$	Х	P _{BRUTO}	ABS _{ferm}	d				
6	$y = m_1 x_1 + m_2 x_2 + m_3 x_3 + b$	Х	P _{PURO}	ABS_{ferm}	d				

TABELA 16 - MODELOS PROPOSTOS PARA AJUSTE DOS DADOS DO ENSAIO 5

TABELA 17 - PARÂMETROS DOS MODELOS PROPOSTOS PARA AJUSTE DOS DADOS DO ENSAIO 5

				540 nm	1				
Madala	Coe	ficientes de	Regressão)	Va	Variáveis Estatísticas			
Widdelo	b	m1	m2	m3	R^2	F	$P(F_{tab} > F_{calc})$		
1	-0,0150	0,405	-	-	0,979	-			
2	-0,0166	0,500	-	-	0,986	-			
3	-0,0156	0,461	-	-	0,985	-			
4	-2,514	6,033	0,142	-	0,970	27,57	0,0480%		
5	-0,695	0,354	0,010	0,276	0,970	64,87	0,0058%		
6	-1,230	1,826	0,043	0,333	0,944	33,84	0,0372%		
600 nm									
Madala	Coe	ficientes de	Regressão)	Va	Variáveis Estatísticas			
Widdelo	b	m1	m2	m3	R2	F	P (Ftab>Fcalc)		
1	-0,0165	0,483	-	-	0,972	-			
2	-0,0188	0,594	-	-	0,981	-			
3	-0,0183	0,552	-	-	0,980	-			
4	-2,348	6,114	0,146	-	0,964	17,11	0,0859%		
5	-0,590	-0,210	-0,004	0,317	0,964	70,84	0,0030%		
6	-0,852	0,347	0,011	0,461	0,924	32,54	0,0079%		

A Figura 30 apresenta um gráfico dos valores da concentração de biomassa calculados pelos modelos (preditos) *versus* os valores obtidos experimentalmente (observados).



FIGURA 30 - VALORES PREDITOS VERSUS OBSERVADOS PARA A BIOMASSA OBTIDOS NO ENSAIO 5: (A) E (B) Absorbância a 540 nm e (C) e (D) absorbância a 600 nm

Dentre os modelos tipo univariável, que desconsideraram o efeito da diluição embutido-o na variável dependente (X/d) e considerando como única variável independente o valor da absorbância corrigida ou não, verificou-se que todos eles apresentaram bom ajuste considerando o coeficiente de explicação do modelo (\mathbb{R}^2) de aproximadamente 0,98. Entretanto, na Figura 21, pode ser observado que o modelo 3 apresentou maior desvio na predição dos valores observados. A diferença entre os modelos 1 e 2 aparentam não ser significativas.

Dentre os modelos do tipo multivariável, em que a variável dependente é a concentração de biomassa no fermentado e o efeito da diluição e da concentração de xantana entram como variáveis independentes, observa-se que os valores preditos pelo modelo 4, que desconsiderou o efeito da xantana, apresentaram desvio acentuado dos valores observado. A diferença entre os modelos 5 e 6 aparentam ser não significativas.

Frente a estes resultados, torna-se necessário decidir o modelo mais adequado para ser utilizado uma vez que tanto a abordagem mais simples quanto a mais complexa apresentaram correlações aceitáveis. Considerando as condições típicas do processo de produção de xantana, com valores da concentração de xantana variando de 5 a 30 g/l tem-se que, quando o fermentado é diluído 5, 10, 20 ou 30 vezes, a concentração de xantana no fermentado diluído situa-se numa faixa de 0,25 a 6 g/l. Nesta faixa de concentração, a correlação linear da curva da concentração de xantana *versus* absorbância é válida (Figura X). Portanto, o modelo que desconta a contribuição da absorbância da xantana (modelo 2) representa uma correlação razoável para ser utilizada na quantificação da biomassa. Adicionalmente, no caso do presente trabalho, em que a xantana foi recuperada do caldo como xantana bruta, foi dada preferência aos modelos que consideram o produto bruto. O modelo utilizado para a determinação de biomassa no presente trabalho, portanto, foi o modelo 2 utilizando o comprimento de onda de 600 nm.

5.3 Região de cisalhamento cálculo dos parâmetros reológicos

Segundo Machado (2002), os fluidos pseudoplásticos apresentam duas regiões com tendência a viscosidade constante, *i.e.*, a ter comportamento newtoniano: Região I, a baixas taxas de cisalhamento, e Região II, a altas taxas de cisalhamento. Portanto, para que seja realizada a determinação dos parâmetros reológicos característicos do comportamento pseudoplástico, estas regiões devem ser identificadas e desconsideradas para o cálculo destes parâmetros.

Para se determinar a região característica do comportamento pseudoplástico foram utilizadas duas amostras de xantana comerciais, uma de grau alimentício e outra de grau industrial cedidas pela CP Kelco. As amostras foram submetidas a análise reológica segundo metodologia descrita na seção 4.5. Os dados da análise reológica estão apresentados na Tabela 18 para a goma xantana de grau alimentício, e na Tabela 19 para xantana de grau industrial.

	Dados	Experimentais		Variáveis Calculadas				
ω(rpm)	γ (s ⁻¹)	τ (lbf/ 100 ft ²)	η (cp)	t (Pa)	LOG [ɣ]	LOG [t]	η (cp)	
600	1021,38	26,8	12,6	12,8	3,01	1,11	12,6	
300	510,69	21,2	19,9	10,2	2,71	1,01	19,9	
200	340,46	18,2	25,7	8,7	2,53	0,94	25,6	
100	170,23	14,4	40,7	6,9	2,23	0,84	40,5	
60	102,14	12,6	59,3	6,0	2,01	0,78	59,1	
30	51,07	10,6	99,3	5,1	1,71	0,71	99,4	
10	17,02	8,3	235,3	4,0	1,23	0,60	233,5	
6	10,21	7,2	339,0	3,4	1,01	0,54	337,6	
3	5,11	6,5	611,5	3,1	0,71	0,49	609,0	
1	1,7	5,0	1405,0	2,4	0,23	0,38	1408,2	

TABELA 18 - DADOS DA ANÁLISE REOLÓGICA DA SOLUÇÃO DE XANTANA DE GRAU ALIMENTÍCIO CPKELCO

TABELA 19 - DADOS DA ANÁLISE REOLÓGICA DA SOLUÇÃO DE XANTANA DE GRAU INDUSTRIAL CPKELCO

Dados Experimentais				Variáveis Calculadas			
ω (rpm)	γ (s ⁻¹)	$\tau (lbf/ 100 \; ft^2)$	η (cp)	τ (Pa)	LOG [γ]	LOG [t]	η (cp)
600	1021,38	27,5	12,9	13,2	3,01	1,12	12,9
300	510,69	21,3	20,0	10,2	2,71	1,01	20,0
200	340,46	18,5	26,0	8,9	2,53	0,95	26,0
100	170,23	14,8	41,8	7,1	2,23	0,85	41,6
60	102,14	12,8	60,2	6,1	2,01	0,79	60,0
30	51,07	10,7	100,3	5,1	1,71	0,71	100,3
10	17,02	8,5	238,5	4,1	1,23	0,61	239,1
6	10,21	7,7	363,5	3,7	1,01	0,57	361,1
3	5,11	6,5	607,3	3,1	0,71	0,49	609,0
1	1,7	5,0	1410,0	2,4	0,23	0,38	1408,2

Para visualizar o comportamento pseudoplástico característico das soluções de xantana, a Figura 31 mostra a curva de viscosidade das soluções de xantana grau alimentício e grau industrial da CP Kelco.



FIGURA 31 - CURVA DE VISCOSIDADE DE UMA SOLUÇÃO DE XANTANA (0,43% P/V) GRAU ALIMENTÍCIO E GRAU INDUSTRIAL DA CP KELCO

A Figura 32 mostra a curva de escoamento das soluções de xantana grau alimentício e grau industrial da CP Kelco em que foram plotados todos os pares $(\dot{\gamma}, \tau)$ obtidos na análise reológica.



FIGURA 32 - CURVA DE ESCOAMENTO DE UMA SOLUÇÃO DE XANTANA (0,43% P/V)

Observa-se, na Figura 33, que a baixas taxas de cisalhamento e altas taxas de cisalhamento a correlação das variáveis ($\dot{\gamma}, \tau$) aparenta ser de natureza linear. De fato, ao se fazer um zoom nestas regiões, verifica-se este comportamento linar. A Figura 33 apresenta o zoom das regiões extremas de taxa de cisalhamento: Região I – rotação de 1 a 10 rpm – e Região II – rotação de 100 a 600 rpm.



FIGURA 33 - REGIÕES DE BAIXAS E ALTAS TAXAS DE CISALHAMENTO

Para a determinação da região intermediária foram desconsiderados os dois pontos extremos de cada região. Portanto, a região intermediária característica do comportamento pseudoplástico das soluções de xantana considerada no presente trabalho foi a região de rotação de 6 a 200 rpm equivalente à região de taxa de cisalhamento de 10,21 a 340,46 s⁻¹.

A Figura 34 mostra os dados obtidos na região intermediária e o resultado da regressão logarítmica dos dados.



FIGURA 34 - REGIÃO INTERMEDIÁRIA DE TAXA DE CISALHAMENTO

A regressão dos dados $(\tau, \dot{\gamma})$ apresentou um bom ajuste ao modelo da lei da potência $\tau = \kappa \cdot \dot{\gamma}^n$ com um coeficiente de explicação do modelo (R²) de 1,00 e 0,99. Os parâmetros reológicos podem ser obtidos da curva de regressão dos gráficos apresentados na Figura 34:

- n = 0,26 e k = 1890 mPa.sⁿ para a xantana de grau alimentício;
- n = 0.25 e k = 2020 mPa.sⁿ para a xantana de grau industrial.

Esta análise da região pseudoplástica foi feita para todas as amostras de xantana produzidas ao final de cada batelada que foram submetidas a análise reológica. Todas as soluções analisadas apresentaram resultados similares, com valores do coeficiente de explicação do modelo (\mathbb{R}^2) maiores que 0,98 na região intermediária. Os parâmetros reológicos *n* e *k* apresentados neste trabalho, portanto, foram determinados com os dados obtidos na região intermediária de taxa de cisalhamento de 10,21 a 340,46 s⁻¹.

5.4 Estabilidade térmica

No processo de produção de goma xantana bruta, a primeira etapa do processo de recuperação (*downstream process*) da goma xantana consiste de um tratamento térmico, que tem como finalidade inativar as células e enzimas bacterianas. Um grupo de pesquisadores (Capron *et al.*, 1997; Capron *et al.*, 1998) apresentou estudos indicando que a goma xantana, após passar por esta etapa de tratamento térmico, apresenta modificações em sua estrutura molecular terciária perdendo sua configuração de dupla hélice e, conseqüentemente, parte de sua capacidade viscosificante.

Para avaliar a ocorrência deste fenômeno de perda de capacidade viscosificante da goma xantana durante o tratamento térmico do fermentado, foi realizado um ensaio em oito condições de [Temperatura-tempo]. Uma das amostras submetida à temperatura de 110° C foi perdida, pois inicialmente tentou-se realizar o tratamento térmico em banho de óleo mas houve formação de espuma em excesso e a amostra extravasou do frasco. O tratamento térmico a 110° C da amostra que restou foi feito em autoclave com o frasco tampado com algodão hidrofóbico por 10 minutos. A Figura 35 apresenta os valores de *n* e *k* do caldo fermentado após 72 horas de incubação antes do tratamento térmico e de amostras deste mesmo fermentado após tratamento térmico em diferentes condições [Temperatura(°C)-tempo(min)].



FIGURA 35 - PARÂMETROS REOLÓGICO DO FERMENTADO ANTES E APÓS DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO TÉRMICO

Em termos de características pseudoplástica e viscosificante de um fluido, quanto mais baixo valor de n, mais pseudoplástico é o fluido, *i.e.*, maior é a queda de viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento, e, quanto maior o valor de k, maior é a viscosidade aparente do fluido numa determinada taxa de cisalhamento e, portanto, maior é a sua capacidade viscosificante.

Portanto, o que se verifica na evolução dos parâmetros n e k é que quanto maior o tempo e a temperatura do tratamento térmico mais pseudoplástico se tornou o caldo fermentado, *i.e.*, a viscosidade aparente aumentou (aumento de k) bem como a variabilidade

desta viscosidade aparente em função da taxa e cisalhamento se tornou maior (menor n). Adicionalmente, verifica-se que há um ponto máximo de n e k na temperatura de 110°C. Estes resultados estão e acordo com o relatado por Iseki *et al.* (2001) que evidenciaram a um aumento na pseudoplasticidade e viscosidade de soluções aquosas e xantana quando submetidas a temperaturas elevadas e repouso, fenômeno este atribuído à formação de géis fracos.

Após o tratamento térmico, a goma xantana em pó recuperada de cada uma das mostras foi submetida a nova análise reológica segundo metodologia da norma API RP 13B-1. A Figura 36 apresenta os parâmetros n e k determinados para as amostras de xantana recuperadas das amostras do mesmo caldo fermentado submetidas às diferentes condições [Temperatura (°C)-tempo(min)] do tratamento térmico.



FIGURA 36 - PARÂMETROS REOLÓGICOS DAS SOLUÇÕES DE XANTANA OBTIDA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO TÉRMICO.

Observa-se que a evolução dos parâmetros n e k em função do binômio [Temperatura-tempo] da goma recuperada apresentou o mesmo perfil dos parâmetros determinados para o caldo fermentado submetido ao tratamento térmico. Capron *et al.* (1997) relataram uma diminuição da viscosidade reduzida da xantana em concentrações de 0,5 a 0,3 g/l quando submetidas a aumento gradual da temperatura de tratamento térmico de 25°C a 60°C. Em outro estudo sobre a viscoelasticidade de amostras de fermentado diluído em soluções aquosas contendo NaCl em diferentes concentrações, Capron *et al.* (1998) relatam que, após submeter uma amostra de fermentado (20 g/l de xantana a 0,02M de NaCl) a um tratamento de aquecimento e resfriamento de 25°C a 90°C num período de 20 minutos, as moléculas de xantana sofreramm desnaturação de sua conformação original resultando em uma menor capacidade viscosificante. Estes fatos, entretanto, não estão de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho que, ao contrário do relatado por Capron *et al.*, evidenciam uma melhora da capacidade viscosificante da goma obtida após tratamento térmico do fermentado a temperatura de 110°C por 10 minutos.

5.5 Produção de xantana por processo de batelada repetida

Inicialmente, foram feitos ensaios preliminares para se avaliar a reprodutibilidade do processo de bateladas repetidas para a produção de goma xantana. A Figura 37 apresenta fotografias que evidenciam alguns aspectos importantes do processo de produção de goma xantana em reator tipo bolha.



FIGURA 37 - FOTOGRAFIAS EVIDENCIANDO ASPECTOS CARACTERÍSTICOS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOMA
A Figura 37 (A) mostra uma fotografia do reator tirada na hora zero da primeira batelada do ciclo. Nesta fotografia, observa-se a boa distribuição das bolhas no reator e a coloração quase transparente do meio inoculado. As Figura 37 (B) e (C) mostram fotografias do reator após decorridas 24 horas de fermentação de duas bateladas distintas. Nestas fotografias, observa-se que há intensa formação de espuma e arraste de fermentado para fora do reator. Após 24 horas, a coloração do fermentado já está mais amarelada evidenciando crescimento celular e a cor mais intensa no fermentado que foi carreado para o Erlenmeyer ("tanque pulmão") indica que muita massa celular foi carreada pela espuma. As Figura 37 (D), (E) e (F) mostram fotografias do reator após 48 horas de fermentação. Nestas fotografias, a coloração amarelada forte evidencia um grande aumento na concentração de biomassa e as bolhas de ar emergem com reduzida velocidade devido à alta viscosidade do caldo rico em goma xantana. As bolhas pequenas tendem a coalescer formando bolhas maiores com maior capacidade emersão devido à maior massa (maior força de empuxo) e menor área superficial (menor tensão de cisalhamento). Este fenômeno de coalescência das bolhas de ar a baixa velocidade superficial foi observado por Al-Masry e Ali (2007) em estudos da formação e distribuição do raio das bolhas em reator de coluna de bolha com soluções de xantana a 10%. Adicionalmente, os pesquisadores evidenciaram que, na região próxima ao distribuidor de ar, as bolhas formadas tendem ser menores com distribuição homogênea e reduzida taxa de formação devido à alta viscosidade do meio conforme pode ser observado nas fotografias da Figura 37 (D) e (E).

5.5.1 Ensaio preliminar

O ensaio preliminar foi realizado com a linhagem *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459^{*}. Este ensaio consistiu de um ciclo de 6 bateladas repetidas de 48h. As condições de operação foram: aeração 1 vvm e temperatura de 28°C. A Figura 38 apresenta o perfil de consumo de sacarose com o tempo para cada batelada.



FIGURA 38 - PERFIL DE CONSUMO DE SUBSTRATO EM CADA BATELADA

A concentração de sacarose inicial nas cinco primeiras bateladas foi de aproximadamente 30 g/l e na sexta batelada este valor foi reduzido para 20 g/l após verificação do alto valor de sacarose residual no fermentado após decorridas as 48 horas de fermentação. A concentração pouco acima de 30 g/l e 20 g/l é resultado da evaporação de água durante e após a esterilização.

A taxa de consumo de sacarose no tempo de 0h até 48h de cada batelada do ciclo variou de 0,25 a 0,35 g/l.h com um valor médio de 0,29 \pm 0,04 g/l.h (p_{distt}= 0,001%). A cada 24 horas, o consumo médio de sacarose foi de 6,2 \pm 1,4 g/l (p_{distt}=8.10⁻⁷%). Por este motivo, uma grande quantidade de sacarose restou no fermentado ao final das 48 horas. Este valor da concentração inicial de sacarose, portanto, precisou ter seu efeito avaliado visando maior conversão e minimizando o valor residual a cada batelada. A Figura 39 mostra o perfil da concentração de sacarose ao longo do ciclo em determinada hora da fermentação para as cinco primeiras bateladas.



FIGURA 39 - PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE A CADA 24 HORAS AO LONGO DE UM CICLO

A concentração de sacarose no mosto, como esperado, apresentou um perfil continuo. Por outro lado, o efeito da diluição do mosto ao ser adicionado ao reator, somado à presença de sacarose residual no inóculo, fez com que houvesse certa variação na concentração de sacarose na hora zero ao longo do ciclo. Esta variação se projetou nas horas subseqüentes como resultado de taxas de consumo de substrato pouco variáveis ao longo do ciclo. Um desvio mais acentuado ocorreu no intervalo de 24h a 48h da batelada 4.

A Figura 40 apresenta a concentração de xantana nos tempos 24h e 48h e o rendimento global de cada batelada, *i.e.*, a massa de xantana produzida por massa de sacarose inicial. O rendimento apresentou pouca variação com um valor máximo de 65% na batelada 6, o que é esperado visto que esta batelada iniciou com menor quantidade de sacarose. Um discreto aumento no rendimento pode ser observado da batelada 3 para a batelada 5. O valor médio do rendimento das cinco primeiras bateladas foi de 46±4% no tempo 24h ($p_{distt}=0,002\%$) e 54±4% no tempo 48h ($p_{distt}=0,001\%$)



FIGURA 40 – VALORES DE (A) RENDIMENTO E (B) CONCENTRAÇÃO DE XANTANA OBTIDOS EM 24H E 48H NO ENSAIO PRELIMINAR

A concentração de xantana média nas cinco primeiras bateladas foi de 14,5 \pm 1,0 g/l (p_{distt}=0,0005%) no tempo 24h e 17,4 \pm 1,2 g/l (p_{distt}=0,0006%) no tempo 48h. Esta menor produção de goma nas ultimas 24 horas pode ser explicada pelo aumento da concentração celular e conseqüente desvio de consumo de substrato para produção de biomassa. Papagianni *et al.* (2001) relatou que a taxa de formação de xantana é maior na fase exponencial de crescimento, comportamento este característico de microorganismos em que a formação de produto é parcialmente associada ao crescimento.

O valor do pH variou de 7,0 a 6,0 ao final das 48h. Em trabalho publicado por Moraine and Rogovin (1971), o valor pH cai para 5,0 nas primeiras 48 horas quando a formação de produto cai consideravelmente. Quando os pesquisadores mantém o pH controlado em 7,0, a concentração final de xantana é de 30 g/l em contraste com 15 g/l conseguidos sem controle de pH. A falta de controle de pH neste ensaio preliminar, portanto, contribui também para uma menor formação de produto nas ultimas 24 horas.

Cabe ainda comentar que os valores calculados para $Y_{P/S}$ (valores não mostrados) apresentaram valores muito altos, inclusive acima de 100%. Estes valores refletem a condição em que o produto é recuperado: precipitação com etanol diretamente do caldo fermentado. A xantana bruta contém impurezas como restos celulares e até mesmo sacarose residual que fica agregada à rede polimérica, como foi apresentado na Seção 5.1.

A Figura 41 mostra o perfil dos parâmetros reológicos de soluções aquosas das amostras de xantana bruta a 0,43% p/v recuperada do caldo fermentado final de cada batelada do ciclo do ensaio preliminar.



FIGURA 41 - PARÂMETROS REOLÓGICOS DA XANTANA BRUTA

Em termos de qualidade pseudoplástica de um fluido, quanto mais baixo valor de n, mais evidente é o desvio do comportamento newtoniano e, portanto, mais pseudoplástico é o fluido, *i.e.*, maior é a diferença entre a viscosidade do fluido a baixíssimas taxas de cisalhamento e a altas taxas de cisalhamento. E, quanto maior o valor de k, maior é a viscosidade aparente do fluido numa determinada taxa de cisalhamento. Sob esta ótica, verifica-se que, os parâmetros reológicos da goma xantana produzida evoluíram para melhores valores, indicando melhoria da qualidade da goma ao longo do ciclo. Os valores de n e k, no entanto, estão abaixo dos valores obtidos para as amostras comerciais da CP Kelco.

5.5.2 Ensaios de otimização

Os ensaios de otimização por planejamento fatorial foram realizados por meio de ciclos de bateladas repetidas. A primeira batelada foi sempre iniciada com as variáveis concentração inicial de sacarose, aeração e temperatura nas condições do ponto central. Os resultados destas bateladas não foram considerados para análise visto que a inoculação do reator foi feita com 10% inóculo contra aproximadamente 18% de fermentado que foi deixado no reator para o inicio das bateladas subseqüentes. Os ciclos variaram de 3 a 8 bateladas consecutivas, incluindo a primeira batelada. Ciclos menores de 3 ou 4 bateladas ocorreram por causa de contaminação do reator ou extravasamento do fermentado para fora do reator como conseqüência de formação de espuma em excesso.

As seguintes respostas foram analisadas quanto ao efeito dos fatores estudados: (1) concentração de xantana em g/L no fermentado após 48 horas de fermentação (X_{48h}), (2) rendimento em xantana calculado como $R = 100 \cdot (X_{48h}/S_{0h})$ em que S_{0h} é a concentração de sacarose na hora zero de cada batelada em g/L e (3) o parâmetro reológico índice de consistência, *k* em mPa.sⁿ.

5.5.2.1 Linhagem NRRL B-1459*

Neste planejamento, foram realizadas mais duas repetições do ponto central chamadas de R1 e R2, totalizando cinco repetições do ponto central. Os ensaios foram realizados em quatro ciclos: (1) bateladas 1 a 3, (2) bateladas 4 a 8, (3) bateladas 9 a 14 e (4) bateladas de 15 a 17. A Tabela 20 apresenta o resultado do planejamento experimental de 3 fatores em configuração estrela com repetição do ponto central.

	Fatores			Respostas			
Ensaio	Sacarose (g/L)	Aeração (vvm)	Temperatura (°C)	Xantana 48h (g/L)	Rendimento (%)	п	k (mPa.s ⁿ)
1	25	1,0	28	9,9	35,1	0,32	900
2	30	0,5	25	11,5	38,9	0,35	615
3	25	1,0	28	9,2	40,0	0,31	1043
4	25	1,0	33	8,4	30,7	0,39	678
5	25	1,0	23	7,5	27,5	0,35	740
6	20	0,5	25	7,1	35,6	0,32	994
7	20	1,5	31	7,6	34,0	0,32	1009
8	25	1,8	28	7,3	26,7	0,33	867
9	30	0,5	31	9,7	33,1	0,33	977
R1	25	1,0	28	9,5	40,7	0,31	925
10	30	1,5	25	10,1	35,7	0,31	1074
11	17	1,0	28	8,3	50,4	0,30	1269
R2	25	1,0	28	8,1	33,1	0,30	1132
12	20	0,5	31	8,6	42,8	0,32	1023
13	20	1,5	25	9,2	45,3	0,35	781
14	33	1,0	28	8,9	27,2	0,31	1026
15	25	1,0	28	8,4	34,8	0,38	527
16	30	1,5	31	9,6	32,2	0,40	526
17	25	0,2	28	8,4	33,0	0,40	348

TABELA 20 - RESULTADO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (NRRL B-1459*)

5.5.2.1.1 Resposta: Concentração de xantana 48h

Para a resposta concentração de xantana 48h, somente o efeito linear do fator concentração inicial de sacarose apresentou significância estatística. O modelo completo de 10 parâmetros, conseqüentemente, não apresentou significância estatística, apresentando coeficiente de explicação do modelo (\mathbb{R}^2) igual a 0,436. Este resultado não representa a realidade do processo cuja produção de xantana sofre influência considerável da quantidade de oxigênio dissolvido diretamente influenciado pela vazão de ar e, em menor extensão, da temperatura.

Este resultado, não conclusivo do efeito dos fatores estudados sobre a resposta, pode ter sido decorrente dos seguintes motivos: (i) falta de controle de outras variáveis

importantes nos ensaios, gerando ruídos na resposta, (ii) limitação experimental – dimensões do reator – e (ii) escolha equivocada da região de estudo dos fatores estudados.

Quanto aos ruídos, uma variável importante do processo que não foi controlada foi a concentração de biomassa na hora zero, *i.e.*, no inóculo de cada batelada. Como os resultados do ensaio preliminar indicaram boa reprodutibilidade, esta variável foi negligenciada. Nos ensaios de validação, entretanto, esta variável foi determinada e considerada para avaliação do processo como será visto mais adiante.

Outra fonte de ruído pode ter sido a falta de controle da concentração inicial de sacarose. O mosto foi preparado com o valor de concentração de sacarose predeterminado pelo planejamento. Entretanto, o mosto além de sofrer efeito de concentração durante a esterilização por conta da evaporação de água, ainda é misturado ao fermentado presente no reator, de forma que a quantidade inicial de sacarose, *i.e.*, na hora zero da fermentação, não é igual à predeterminada pelo planejamento. A Figura 42 mostra os valores de concentração de sacarose predeterminada pelo planejamento, da concentração de sacarose no mosto e no fermentado na hora zero de cada batelada. O efeito destas fontes de ruído na resposta provavelmente foi tão importante quanto o efeito dos fatores estudados.



FIGURA 42 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE: PLANEJADA, NO MOSTO E NA HORA ZERO DA FERMENTAÇÃO (NRRL B-1459*)

Outra limitação nos ensaios foram as reduzidas dimensões do reator, que foi desenhado para caber na autoclave. A altura de trabalho foi de 24 cm e o diâmetro de 6 cm. A altura reduzida diminui o tempo de residência das bolhas de ar no reator, reduzindo assim o tempo para transferência de oxigênio. Esta transferência fica ainda mais prejudicada na medida em que e goma é produzida pois o diâmetro reduzido faz com que os efeitos de parede sejam mais proeminentes. O fermentado torna-se mais viscoso e exibe propriedades peseudoplásticas típicas das soluções aquosas de xantana, *i.e.*, nas regiões mais afastadas do fluxo de ar, especificamente na parede interna do reator, a viscosidade é mais alta e há estagnação do fluido com o aprisionamento de bolhas de ar conforme pode ser visto nas fotografias apresentadas na Figura 37.

Para se avaliar a variabilidade da resposta concentração final de xantana, fez-se uma análise estatística de dois conjuntos dos valores obtidos considerando-as como pertencentes a uma mesma população. Os conjuntos avaliados foram: (i) todos os valores de concentração de xantana 48h obtidos no planejamento e (ii) somente os valores de concentração de xantana 48h obtidos nos ensaios no ponto central. A Tabela 21 apresenta a estatística descritiva e Figura 43 apresenta os histograma e o Box Plot destes conjuntos.

	Repetição no ponto central	Todos os ensaios
Número de amostras	5	19
Média	9,0	8,8
Intervalo de confiança 95%	8,1 a 10,0	8,3 a 9,3
Mínimo - Máximo	8,1 - 9,9	7,1 – 11,5
Variância	0,583	1,23
Desvio Padrão	0,764	1,11
Erro Padrão	0,342	0,254

TABELA 21 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES OBTIDOS PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H (NRRL B-1459*)



FIGURA 43 - HISTOGRAMA E BOX PLOT PARA OS VALORES DA RESPOSTA CONCENTRAÇÃO FINAL DE XANTANA (NRRL B-1459*)

Observa-se que a distribuição dos valores do ponto central visualmente não se ajustou bem ao esperado para uma distribuição normal uma vez que o numero de amostras é de apenas cinco valores de concentração de xantana 48h. Entretanto, o teste de Shapiro Wilk indica que a distribuição destes valores pode ser considerada como a normal (p> 0,05 e W > 0,9). A distribuição dos valores da concentração final de xantana obtidos em todos os ensaios visualmente se aproxima de uma distribuição normal o que é confirmado teste de Shapiro-Wilk (p>0,05 e W>0,9). A comparação dos valores médios e desvios padrão dos dois conjuntos por meio do Box plot, confirma que, estatisticamente, os valores da concentração final de xantana provêm de uma mesma população. E o fato de todos estes valores terem apresentado esta distribuição normal é mais um indicativo de que a escolha dos níveis dos efeitos estudados não foi significativa de modo a superar o efeito dos ruídos existentes no processo.

5.5.2.1.2 Resposta: Rendimento

Para a resposta Rendimento, somente os efeitos linear e quadrático do fator concentração inicial de sacarose e o efeito de interação dos fatores temperatura e vazão de ar apresentaram significância estatística conforme apresentado no gráfico de pareto na Figura 44. O modelo completo de 10 parâmetros apresentou um valor de 0,696 para coeficiente de determinação do modelo (R^2) conforme apresentado na análise de variância (ANOVA) mostrada na Tabela 22. O modelo de 10 parâmetros não foi estatisticamente significativo uma vez que o valor de F calculado é menor que o valor tabelado embora o teste F para o ajuste do modelo aos dados experimentais tenha indicado um bom ajuste ($F_{Calculado} < F_{Tabelado}$).

TABELA 22 - ANOVA - MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO (NRRL B-1459*)

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{CALCULADO}	F _{TABELADO} (0,05%)	F _{Calculado} F _{Tabelado}
Regressão	503,9	9	56,0			
Resíduo	220,5	9	24,5	2,3	3,18	0,72
Falta de Ajuste	192,68	5	38,5			
Erro Puro	27,83	4	7,0	5,5	6,26	0,89
Total	724,38	18				
Variação Explica	nda (R ²)	0,696		Variação E	xplicável (R)	0,962



Effect Estimate (Absolute Value)

FIGURA 44 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS REFERENTES AO MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO (NRRL B-1459*)

O modelo de quatro parâmetros, que desprezou os efeitos não significativos, apresentou o coeficiente de determinação do modelo pouco menor ($R^2=0,644$), conforme ANOVA apresentada na A Tabela 23.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{CALCULADO}	F _{TABELADO} (0,05%)	F _{Calculado} F _{Tabelado}
Regressão	466,5	3	155,5			
Resíduo	257,8	15	17,2	9,0	3,29	2,75
Falta de Ajuste	230,02	11	20,9			
Erro Puro	27,83	4	7,0	3,0	5,94	0,51
Total	724,38	18				
Variação Explica	nda (R²)	0,644		Variação E	xplicável (R)	0,962

TABELA 23 - ANOVA - MODELO DE 4 PARÂMETROS PARA A RESPOSTA RENDIMENTO (NRRL B-1459*)

O teste F para se avaliar a significância estatística da regressão apesar de positivo $(F_{Calculado}>F_{Tabelado})$ não é adequado para fins de predição segundo Barros *et al.* (2001) que sugerem que $F_{Calculado}$ seja pelo menos 10 vezes o valor de $F_{Tabelado}$. Por outro lado, o teste F para se avaliar a falta de ajuste do modelo aponta para um bom ajuste do modelo $(F_{Calculado}<F_{Tabelado})$, *i.e.*, os resíduos devido à falta de ajuste são maiores que o erro puro associado às repetições no ponto central. Mesmo não apresentando a significância estatística recomendada, o modelo pode ser útil para fins de orientação para novas regiões de estudo. As superfícies de respostas para a resposta rendimento construídas com base no modelo de quatro parâmetros foram plotadas e são apresentadas na Figura 45.



FIGURA 45 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA O RENDIMENTO (NRRL B-1459*)

A superfície de resposta do binômio [Temperatura,Vazão] sugere uma relação inversa para o binômio temperatura e vazão de ar na maximização do rendimento. Na verdade, a baixa temperatura favorece o crescimento da biomassa em detrimento da formação de xantana, conforme relatado por Shu e Yang (1989), e a alta aeração compensa este efeito melhorando tanto a homogeneização do meio quanto a transferência de oxigênio conforme relatado por Suh *et al.* (1992) e Pons *et al.* (1990), aumentando, portanto, a taxa de formação de produto . Por outro lado, o aumento da temperatura favorece a formação de produto, conforme relatado por Shu e Yang (1989), contrabalançando os efeitos da diminuição da disponibilidade de oxigênio.

As superfícies de resposta dos binômios [Temperatura,Sacarose] e [Vazão,Sacarose] evidenciam o aumento do rendimento com a diminuição da concentração

de sacarose. Esta relação é esperada uma vez que a pouca variabilidade nas taxas de consumo de sacarose e de produção de xantana observada faz com que, quanto maior a concentração inicial de sacarose, menor seja o rendimento e vice-versa. A Figura 46 mostra os valores da concentração de xantana final em ordem crescente, a concentração de sacarose na hora zero e o rendimento final de cada batelada.



FIGURA 46 – CONCENTRAÇÃO E RENDIMENTO FINAL DE XANTANA E CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA HORA ZERO EM CADA BATELADA (NRRL B-1459*)

Verifica-se que as curvas delineadas pelos pontos experimentais da concentração de sacarose e pelos pontos calculados do rendimento são praticamente a imagem de espelho uma da outra, confirmando a afirmação anterior. Estas curvas se afastam na medida em que a concentração de xantana aumenta – uma tendência matematicamente é óbvia. Este resultados indicam que a taxa de formação de produto não sofre influência da concentração inicial de substrato estando de acordo com o relatado por Schweickart e Quinlan (1989).

Cabe analisar a estatística descritiva dos conjuntos de valores de rendimento em xantana obtidos nos ensaios do ponto central em comparação com os valores obtidos em todos os ensaios. A Tabela 24 apresenta a estatística descritiva e a Figura 46 mostra o Box plot dos valores de rendimento em xantana destes dois conjuntos.

TABELA 24 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES OBTIDOS PARA A RESPOSTA RENDIMENTO (NRRL B-1459*)

	Repetição no ponto central	Todos os ensaios
Número de amostras	5	19
Média	39,1	38,8
Intervalo de confiança 95%	35,8 - 42,4	35,7 - 41,9
Mínimo - Máximo	35,6 - 42,0	29,9 - 51,9
Variância	7,0	40,2
Desvio Padrão	2,6	6,3
Erro Padrão	1,2	1,4





Os valores médios do rendimento para os dois conjuntos foram muito próximos e os desvios observados no Box Plot coerentes com a origem do conjunto de valores, sendo maiores para a média dos valores obtidos por todos os ensaios evidenciando a variabilidade do rendimento frente a variação da concentração de inicial sacarose como já comentado.

Por outro lado, a menor variabilidade dos valores do rendimento no ponto central pode ser atribuída à variabilidade da concentração de sacarose na hora zero. A Figura 48 evidencia a correlação entre os valores da concentração de sacarose planejados, da concentração de sacarose na hora zero e da concentração de xantana com os valores da resposta rendimento em xantana obtidos nos ensaios do ponto central.



FIGURA 48 - RENDIMENTO EM XANTANA, CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA HORA ZERO E CONCENTRAÇÃO DE XANTANA OBTIDOS NOS ENSAIOS DO PONTO CENTRAL

5.5.2.1.3 Resposta: Índice de consistência (k)

Nenhum efeito apresentou significância estatística para a resposta ínidice de consistência. O modelo completo de 10 parâmetros para predição do valor de k não se ajustou bem aos dados experimentais apresentando um valor de 0,525 para coeficiente de explicação do modelo (\mathbb{R}^2). Neste caso, vale uma análise comparativa da estatística descritiva de cada conjunto de valores: (i) dos obtidos no ponto central e (ii) dos obtidos em todos os ensaios. A Tabela 25 apresenta a estatística descritiva e a Figura 49 mostra o histograma e o Box plot dos valores do índice de consitência destes dois conjuntos.

	Repetição no ponto central	Todos os ensaios
Número de amostras	5	19
Média	905	866
Intervalo de confiança 95%	618 - 1193	751 - 981
Mínimo - Máximo	527-1132	348 - 1269
Variância	53568	57311
Desvio Padrão	232	239
Erro Padrão	104	55

TABELA 25 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA (NRRL B-1459*)



FIGURA 49 - HISTOGRAMA E BOX PLOT PARA OS VALORES DA RESPOSTA K (NRRL B-1459*)

Os valores médios para o valor do índice de consistência (k) para os dois conjuntos foram muito próximos e os desvios padrão observados nos Box Plots evidenciam que o desvio padrão de k obtidos nos ensaios do ponto central foi tão grande quanto o dos obtidos em todos os ensaios.

Cabe ressaltar que as bateladas 15, 16 e 17 corresponderam ao último ciclo de ensaios realizados do planejamento e em todos estes ensaios foram obtidos baixos valores do índice de consistência (527, 526 e 348, respectivamente) e baixos valores de consumo de sacarose (0,9, 0,8 e 0,11, respectivamente) evidenciando um forte desvio que provavelmente foi originado de um erro grosseiro, conforme versa a estatística, mas que não teve a sua fonte identificada.

5.5.2.1.4 Otimização do processo utilizando a função desejabilidade

Para a otimização do processo em reator de bolha da linhagem NRRL B-1459* utilizando a função desejabilidade, os dados obtidos no planejamento experimental foram ajustados ao modelo *spinline* (polinomial cúbico) para cada resposta $Y_{i,j} = f_i(X_1, X_2, X_3)$. Os parâmetros para o cálculo da função desejabilidade para cada resposta está apresentado na Tabela 26.

	d=0	d=0,5	d=1	Curv	atura
Respostas	Mínimo	Médio*	Máximo	S	t
Rendimento (%)	29,9	41	52	0,1	1,0
Concentração de Xantana (g/L)	7,1	9,3	11,5	0,1	1,0
Índice de consistência k (m.Pa.s ⁻¹)	348	1000	1269	0,1	10

TABELA 26 - PARÂMETROS DA CURVA DE DESEJABILIDADE PARA CADA RESPOSTA (NRRL B-1459*)

*corresponde ao valor médio mais aceitável para o processo

A Figura 50 apresenta, nas primeiras três linhas e três colunas, o perfil de cada resposta Y_i em função de cada fator X_i isoladamente, na ultima coluna, apresenta a função desejabilidade d_i para cada resposta individualmente em função das respostas X_i e a ultima linha mostra o perfil da função desejabilidade global D para as três respostas em função do fator X_i mantendo-se os outros fatores no seu valor ótimo.



FIGURA 50 – PERFIL DAS RESPOSTAS E FUNÇÃO DESEJABILIDADE PARA CADA FATOR ESTUDADO (NRRL B-1459*)

O resultado da otimização utilizando a função desejabilidade, portanto, indica que as condições ótimas de processo de batelada repetida em reator de coluna bolha utilizando a linhagem NRRL B-1459*, dentro das restrições estabelecidas na Tabela 26, são concentração de sacarose em 17 g/L, aeração em 1 vvm e temperatura em aproximadamente 31°C. A Figura 51 apresenta as curvas de contorno para a função desejabilidade global D em função dos fatores estudados mantendo-se o terceiro fator no seu ponto ótimo.



FIGURA 51 – CURVAS DE CONTORNO DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE (NRRL B1459*)

5.5.2.2 Linhagem ATCC 13951

Os ensaios foram realizados em três ciclos: (1) bateladas 1 a 8, (2) bateladas 9 a 12 e (3) bateladas 13 a 17. A Tabela 27 apresenta o resultado do planejamento experimental de 3 fatores em configuração estrela com repetição do ponto central.

	Fatores			Respostas			
Ensaio	Sacarose (g/L)	Aeração (vvm)	Temperatura (°C)	Xantana 48h (g/L)	Rendimento (%)	n	k (mPa.s ⁿ)
1	25	1,0	28	11,0	49,6	0,28	1282
2	30	0,5	25	7,7	27,7	0,25	1653
3	25	1,0	28	8,8	36,9	0,25	1781
4	25	1,0	33	14,3	63,9	0,24	2035
5	25	1,0	23	9,5	44,0	0,30	931
6	20	0,5	25	11,4	65,3	0,29	1029
7	20	1,5	31	14,6	86,0	0,29	1108
8	25	1,8	28	12,1	53,6	0,30	1098
9	30	0,5	31	9,3	31,7	0,29	1246
10	30	1,5	25	10,8	38,4	0,30	1175
11	17	1,0	28	9,2	49,8	0,29	1137
12	20	0,5	31	10,3	47,0	0,32	1062
13	20	1,5	25	9,7	66,0	0,31	899
14	33	1,0	28	9,9	47,2	0,29	1227
15	25	1,0	28	12,5	57,1	0,30	1066
16	30	1,5	31	11,7	52,9	0,29	1152
17	25	0,2	28	11,3	36,7	0,31	994

TABELA 27 - RESULTADO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA LINHAGEM ATCC 13951

5.5.2.2.1 Resposta: Concentração de Xantana 48h

Para a resposta concentração de xantana 48h, o modelo completo de 10 parâmetros não se ajustou bem aos dados experimentais apresentando um valor de 0,645 para o coeficiente de explicação do modelo (R^2). Nenhum efeito apresentou significância estatística conforme o gráfico de Pareto dos efeitos calculados para modelo completo (10 parâmetros) apresentado na Figura 52.



FIGURA 52 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H (ATCC 13951)

Neste caso, as mesmas considerações feitas acerca dos resultados obtidos para a resposta concentração de xantana (48h) obtidas nos ensaios para linhagem NRRL B-1459* valem para a linhagem ATCC 13951, *i.e.*, os ruídos do processo influenciaram a resposta tanto quanto os fatores estudados. Cabe ainda uma analise comparativa da estatística descritiva dos dois conjuntos de valores: (1) valores obtidos nos ensaios do ponto central e (2) valores obtidos em todos os ensaios do planejamento. A Tabela 28 mostra a estatística descritiva e a Figura 53 apresenta o Box plot de cada conjunto de valores da resposta concentração de xantana 48h.

	Repetição no ponto central	Todos os ensaios
Número de amostras	3	17
Média	10,7	10,8
Intervalo de confiança 95%	6,1 - 15,4	9,9 -11,8
Mínimo - Máximo	8,8 - 12,5	7,7 - 14,6
Variância	3,47	3,5
Desvio Padrão	1,86	1,87
Erro Padrão	1,075	0,453

TABELA 28 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H (ATCC 13951)



FIGURA 53 - BOX PLOT PARA OS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H (ATCC 13951)

Comparando-se os dois conjuntos de valores verifica-se que a variabilidade dos valores obtidos nos ensaios no ponto central foi tão grande quanto a variabilidade dos valores obtidos em todos os ensaios do planejamento que sofreram a influência dos efeitos estudados.

5.5.2.2.2 Resposta: Rendimento

Para a resposta rendimento, somente o efeito linear da concentração inicial de sacarose apresentou significância estatística conforme apresentado pelo gráfico de pareto na Figura 54.



FIGURA 54 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO (ATCC 13951)

O coeficiente de determinação do modelo (R^2) de 10 parâmetros apresentou valor de 0,788 conforme apresentado na ANOVA apresentada na Tabela 29.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{CALCULADO}	F _{TABELADO} (0,05%)	<u>F_{Calculado}</u> F _{Tabelado}
Regressão	2560,8	9	284,5			
Resíduo	689,3	7	98,5	2,9	3,68	0,79
Falta de Ajuste	570,05	5	114,0			
Erro Puro	119,21	2	59,6	1,9	19,30	0,10
Total	3250,06	16				
Variação Explicada (R ²)		0,788		Variação E	xplicável (R)	0,963

TABELA 29 - ANOVA - MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO (ATCC 55298)

O teste F para se avaliar a significância estatística do modelo completo foi negativo ($F_{Calculado} < F_{Tabelado}$) embora o teste F para a falta de ajuste tenha sido positvo ($F_{Calculado} < F_{Tabelado}$), *i.e.*, mesmo com o modelo tendo apresentado não significância estatística, os resíduos orginados da falta de ajuste foram menores que os resíduos originados da repetições no ponto central (erro puro). O modelo de 10 parâmetros, portanto, não é adequado para descrever a relação entre o rendimento e os fatores estudados. O

modelo de dois parâmetros considerando somente o efeito linear da concentração de sacarose apresentou R^2 igual a 0,456 e falta e significância estatística.

As causas deste resultado não significativo para o ajuste de um modelo de segunda ordem empírico preditivo envolvendo os fatores estudados são as mesmas consideradas para os ensaios conduzidos com a linhagem NRRL B-1459*: falta de controle da concentração inicial de biomassa, da concentração de sacarose na hora zero ou região de estudo dos fatores não significativa. Cabe ainda mencionar que a significância estatística do efeito linear da concentração inicial de sacarose deve-se à dependência do rendimento com esta variável conforme discutido anteriormente a respeito dos resultados da resposta rendimento obtidos para a linhagem NRRL B-1459*. Figura 55 mostra a variabilidade da concentração inicial de sacarose na hora zero de cada batelada.



FIGURA 55 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE: PLANEJADA, NO MOSTO E NA HORA ZERO DA FERMENTAÇÃO (ATCC 13951)

Uma análise da estatística descritiva dos dois conjuntos de valores é válida para evidenciar a variabilidade desta resposta frente aos valores dos fatores estudados. A Tabela X mostra a estatística descritiva dos dois conjuntos de valores: (1) valores obtidos nos ensaios do ponto central e (2) valores obtidos em todos os ensaios do planejamento. A Tabela 30 mostra a estatística descritiva e a Figura 56 apresenta o Box plot de cada conjunto de valores da resposta rendimento.

	Repetição no ponto central	Todos os ensaios
Número de amostras	3	17
Média	45,7	48,6
Intervalo de confiança 95%	26,6-64,9	41,2 - 55,9
Mínimo - Máximo	36,7 - 50,8	27,7 - 86,0
Variância	59,6	203,1
Desvio Padrão	7,7	14,3
Erro Padrão	4,46	3,46





FIGURA 56 - BOX PLOT PARA OS VALORES DE RENDIMENTO (ATCC 13951)

Similarmente ao dissertado para os resultados do rendimento obtidos para a linhagem NRRL B-1459*, a maior variabilidade do rendimento observada no conjunto dos valores obtidos em todos os ensaios é uma conseqüência da variabilidade da concentração inicial de sacarose.

5.5.2.2.3 Resposta: Índice de consistência (k)

Para esta resposta, nenhum efeito apresentou significância estatística e o coeficiente de determinação do modelo (R^2) apresentou o valor de 0,490. A Tabela 31 mostra a estatística descritiva e a Figura 57 o Box plot dos dois conjuntos de valores de k: (1) obtidos nos ensaios do ponto central e (2) os obtidos em todos os ensaios.

	Repetição no ponto central	Todos os ensaios
Número de amostras	3	17
Média	1376	1228
Intervalo de confiança 95%	465 - 2287	1069 - 1387
Mínimo - Máximo	1066 - 1781	899 - 2035
Variância	134450	95909
Desvio Padrão	366,7	310
Erro Padrão	211,7	75

TABELA 31 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DE K (ATCC 13951)



FIGURA 57 - BOX PLOT PARA OS VALORES DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA (ATCC 13951)

A média e o desvio padrão dos valores de k obtidos nos ensaios ponto central foram um pouco maior que os obtidos para o conjunto de valores obtidos em todos os ensaios. A grande variabilidade do índice de consistência no ponto central evidenciando o quanto os ruídos do sistema influenciaram nesta resposta.

5.5.2.2.4 Otimização do processo utilizando a função desejabilidade

Para a otimização do processo em reator de bolha da linhagem ATCC 13951, utilizando a função desejabilidade, os dados obtidos no planejamento experimental foram ajustados ao modelo *spinline* (polinomial cúbico) para cada resposta $Y_{i,j} = f_i(X_1, X_2, X_3)$. Os parâmetros para o cálculo da função desejabilidade para cada resposta está apresentado na Tabela 32.

	d=0	d=0,5	d=1	Curv	atura
Respostas	Mínimo	Médio*	Máximo	S	t
Rendimento (%)	30	60	90	0,1	1,0
Concentração de Xantana (g/L)	7,7	11,2	14,7	0,1	1,0
Índice de consistência k (m.Pa.s ⁻¹)	890	1500	2100	0,1	10

TABELA 32 - PARÂMETROS DA CURVA DE DESEJABILIDADE PARA CADA RESPOSTA (ATCC 13951)

*correponde ao valor médio mais aceitável para o processo

A Figura 58 apresenta, nas primeiras três linhas e três colunas, o perfil de cada resposta Y_i em função de cada fator X_i isoladamente, na ultima coluna, apresenta a função desejabilidade d_i para cada resposta individualmente em função das respostas X_i e a ultima linha mostra o perfil da função desejabilidade global D para as três respostas em função do fator X_i mantendo-se os outros fatores no seu valor ótimo.



FIGURA 58 – PERFIL DAS RESPOSTAS E FUNÇÃO DESEJABILIDADE PARA CADA FATOR ESTUDADO (ATCC 13951)

O resultado da otimização utilizando a função desejabilidade, portanto, indica que as condições ótimas de processo de batelada repetida em reator de coluna bolha utilizando a

linhagem ATCC 13951, dentro das restrições estabelecidas na Tabela 32, são concentração de sacarose de 17 a 20 g/L, vazão de ar de aproximadamente 1 vvm e temperatura de 33°C. A Figura 59 apresenta as curvas de contorno para a função desejabilidade global D em função dos fatores estudados mantendo-se o terceiro fator no seu ponto ótimo.



FIGURA 59 – CURVAS DE CONTORNO DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE (ATCC 13951)

5.5.2.3 Análise comparativa dos resultados obtidos para as linhagens NRRL B-1459* e ATCC 55298.

Conforme comentado na seção Material e Métodos, a linhagem NRRL B-1459* apresentou valores de concentração final de xantana e de qualidade da goma inferiores aos obtidos para a linhagem ATCC13951. Para verificar se houve alguma degradação da linhagem conservada por longo tempo em freezer, fez-se uma análise comparativa entre os resultados obtidos para a linhagem NRRL B-1459* e a linhagem ATCC 13951.

Cabe ressaltar, que esta análise comparativa leva em consideração os valores observados em todas as bateladas do planejamento experimental em que houve grande variabilidade das condições do processo de produção da goma e outras fontes de variabilidade já mencionadas, sendo a mais crítica a concentração inicial de células em cada batelada. Portanto, a análise estatística da média dos valores da concentração de xantana e do índice de consistência obtidos para cada linhagem não foi obtida em condições altamente controladas de ensaio de modo que uma diferença estatisticamente significativa entre as média sugere fortemente que a fonte de variabilidade foi a linhagem utilizada nos ensaios. A Figura 60 apresenta o Box plot para a média do conjunto de todos os valores da concentração final de xantana 48h obtidos nos ensaios do planejamento fatorial para a linhagem NRRL B-1459^{*} e para a linhagem ATCC 13951 e a Tabela 33 mostra o resultado do teste t de Student.

Linhagam	Índice de consistência <i>k</i> (mPa.s ⁿ)				Concentração de xantana 48h (g/L)			
Linnagem	Média	t-valor	df	р	Média	t-valor	df	р
ATCC	10,8	-	-	-	1228	-	-	-
NRRL	8,8	4,00	34	0,00032	866	3,9	34	0,00038

TABELA 33 – TESTE T PARA MÉDIAS POPULACIONAIS INDEPENDENTES



FIGURA 60 - BOX PLOT PARA COMPARAÇÃO DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA E DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA (NRRL B-1459* VERSUS ATCC 13951)

O p-valor para o teste t de Student foi menor que 0,001 tanto para a comparação das médias dos valores da concentração de xantana quanto para a média dos valores do índice de consistência de cada linhagem indicando que tratam-se de populações distintas e sugerindo, portanto, que a linhagem NRRL B-1459* pode ter sofrido degradação devido ao longo tempo de estocagem. Uma simples inspeção no Box plot aponta que as médias são distintas. Esta mesma abordagem foi utilizada por Galindo *et al.* (1994) para distinguir a linhagem NRRL B-1459 de uma variante espontânea E2 isolada por Ramírez (1993, *apud* Galindo *et al.*, 1994).

A média dos valores de concentração final de xantana e a média dos valores de índice de consistência foram 23% e 42% maior para a linhagem ATCC 55298, respectivamente. Estes resultados estão em concordância com a variabilidade relatada por Cadmus *et al.* (1976) que verificou diferença de 60% na viscosidade final do caldo e de 55% no rendimento final de fermentações de 48 h em frascos agitados conduzidas sob as mesmas condições. A viscosidade do fermentado, entretanto, é dependente da concentração de xantana de modo que parte da variabilidade nos valores da viscosidade final do fermentado é devido à diferença de concentração. No caso dos valores do índice de consistência determinados no presente trabalho, todos foram determinados em soluções com a mesma concentração de xantana e nas mesmas condições experimentais de modo que a variabilidade residiu no processo e na linhagem que a produziu.

5.5.2.4 Linhagem ATCC 55298

Os ensaios foram realizados em três ciclos: (1) bateladas 1 a 5, (2) bateladas 6 a 11 e (3) bateladas 12 a 17. A Tabela 34 apresenta o resultado do planejamento experimental de 3 fatores em configuração estrela com repetição do ponto central.

	Fatores			Respostas			
Ensaio	Sacarose (g/L)	Aeração (vvm)	Temperatura (°C)	Xantana (g/L)	Rendimento (%)	n	k (mPa.s ⁿ)
1	25	1,0	28	9,3	39,3	0,27	1601
2	30	0,5	25	9,6	34,2	0,27	1437
3	25	1,0	28	10,4	44,2	0,26	1590
4	25	1,0	33	11,3	48,8	0,29	1354
5	25	1,0	23	11,3	48,7	0,29	1155
6	20	0,5	25	12,0	56,0	0,27	1485
7	20	1,5	31	10,1	53,9	0,27	1686
8	25	1,8	28	13,4	62,3	0,26	1506
9	30	0,5	31	9,9	37,6	0,27	1597
10	30	1,5	25	12,3	46,8	0,30	1140
11	17	1,0	28	13,0	80,1	0,30	1200
12	20	0,5	31	8,6	47,0	0,26	1807
13	20	1,5	25	11,0	66,0	0,30	1053
14	33	1,0	28	11,8	47,2	0,26	1673
15	25	1,0	28	12,6	57,1	0,26	1556
16	30	1,5	31	13,4	52,9	0,25	1692
17	25	0,2	28	8,2	36,7	0,27	1600

TABELA 34 - RESULTADO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA LINHAGEM ATCC 55298

5.5.2.4.1 Resposta: Concentração de xantana 48h

Para a resposta concentração de xantana 48h, nenhum efeito apresentou significância estatística no nível de significância de 5% conforme gráfico de Pareto apresentado na Figura 61. O modelo completo de 10 parâmetros, conseqüentemente, não foi estatisticamente significativo apesar de ter apresentando um valor de 0,728 para coeficiente de explicação (\mathbb{R}^2).



FIGURA 61 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO COMPLETO PARA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H

As mesmas considerações feitas acerca dos resultados obtidos para a resposta concentração de xantana 48h nos ensaios com as linhagens NRRL B-1459* e ATCC 13951 valem para a linhagem ATCC 55298, *i.e.*, os ruídos do processo influenciaram a resposta tanto quanto os fatores estudados. Cabe, portanto, fazer uma analise comparativa por meio da estatística descritiva dos dois conjuntos de valores da concentração de xantana 48h: (1) obtidos nos ensaios do ponto central e (2) obtidos em todos os ensaios. A Tabela 35 mostra a estatística descritiva e a Figura 62 apresenta o Box plot de cada conjuntos de valores da resposta concentração de xantana 48h.

	Repetição no ponto central	Todos os ensaios
Número de amostras	3	17
Média	10,8	11,1
Intervalo de confiança 95%	6,6 - 14,9	10,2 - 11,9
Mínimo - Máximo	9,3 - 12,6	8,2 - 13,4
Variância	2,8	2,7
Desvio Padrão	1,68	1,64
Erro Padrão	0,97	0,40

TABELA 35 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE XANTANA 48H (ATCC 55298)



FIGURA 62 - BOX PLOT PARA OS VALORES DE P (ATCC 55298)

Uma análise comparativa entre os dois conjuntos de valores confirma que a variabilidade dos valores no ponto central foi tão grande quanto a variabilidade de todos os valores obtidos nos ensaios do planejamento que sofreram a influência dos efeitos estudados.

5.5.2.4.2 Resposta:Rendimento (R)

Para a resposta rendimento em xantana (R), nenhum dos efeitos estudados apresentou significância estatística no nível de significância de 5% conforme mostrado no gráfico de Pareto dos efeitos apresentado na Figura 63.



FIGURA 63 - GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS DO MODELO COMPLETO PARA A VARIÁVEL R (ATCC 55298)

Nesta caso, os ruídos do processo influenciaram a resposta tanto quanto os fatores estudados. Uma das fontes de ruídos fpo a variabilidade da concentração de sacarose na hora zero de fermentação que está evidenciada na Figura 64.



FIGURA 64 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE: PLANEJADO (S), NO MOSTO E NA HORA ZERO DA FERMENTAÇÃO (ATCC 55298)

Similarmente ao dissertado com relação aos resultados obtidos para a linhagem NRRL B-1459*, a variabilidade dos valores de R é diretamente proporcional à variação da

concentração de xantana (P) e inversamente proporcional á concentração de sacarose na hora zero (S_{0h}): $R = P/S_{0h}$. A resposta R, portanto, acompanha tendência a observada para a resposta P acrescida dos ruídos dos valores de S_{0h}. A Figura 65 mostra os valores da concentração de xantana (P) em ordem crescente, a concentração de sacarose na hora zero (S_{0h}) e o rendimento (R) de cada batelada.



FIGURA 65 - VARIÁVEIS R, P E S_{0h} para cada batelada (ATCC 55298)

Seguindo a tendência observada para a linhagem NRRL B-1459*, verifica-se que as curvas delineadas pelos pontos experimentais da concentração de sacarose e pelos pontos calculados do rendimento são praticamente a imagem de espelho uma da outra, confirmando a afirmação anterior. E estas curvas se afastam na medida em que a concentração de xantana aumenta.

E, uma vez que, para o rendimento, não foram determinadas correlações significativas com os fatores estudados vale analisar a estatística descritiva dos conjuntos de valores de R obtidos nos ensaios do ponto central em comparação com os valores obtidos em todos os ensaios. A Tabela 36 apresenta a estatística descritiva e a Figura 66 mostra o histograma e o Box plot dos valores de R destes dois conjuntos.

	Repetição no ponto central	Todos os ensaios
Número de amostras	3	17
Média	46,9	50,5
Intervalo de confiança 95%	23,9 - 69,8	44,5 - 56,5
Mínimo - Máximo	39,3 - 57,1	34,2 - 80,1
Variância	85,1	136,1
Desvio Padrão	9,2	11,7
Erro Padrão	5,33	2,83

TABELA 36 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS VALORES DA RESPOSTA RENDIMENTO (ATCC 55298)



FIGURA 66 - BOX PLOT PARA OS VALORES DA RESPOSTA R (ATCC 55298)

Os valores médios para o valor do rendimento em xantana (R) para os dois conjuntos foram muito próximos e os desvios observados no Box Plot coerentes com a fontes dos valores analisados: maiores para a média de todos os valores refletindo a maior variabilidade do processo frente a variação dos fatores estudados, embora seus efeitos não tenham sido significativos..
5.5.2.4.3 Resposta: Índice de consistência (k)

Para a resposta índice de consistência (k) somente o efeito quadrático da vazão de ar (V) e o efeito de interação entre sacarose (S) e temperatura (T) não apresentaram significância estatística conforme mostrado no gráfico de Pareto dos efeitos calculados para modelo completo (10 parâmetros) apresentado na Figura 67. A análise de variância do modelo completo está apresentada na Tabela 37.



FIGURA 67 - GRÁFICO DE PARETO DO MODELO COMPLETO PARA A VARIÁVEL K (ATCC 55298)

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	v1	v_2	pvalor
Regressão	594481,3	9	66053,5				
Resíduo	197858,0	7	28265,4	2,3	9	7	0,14
Falta de Ajuste	196728,20	5	39345,6				
Erro Puro	1129,80	2	564,9	69,7	5	2	0,01
Total	792339,30	16					
Variação Explicada (R ²)		0,750		Variação Explicável (R)			0,999

TABELA 37 - ANOVA DO MODELO COMPLETO PARA A RESPOSTA K (ATCC 55298)

O modelo completo apresentou um valor para coeficiente de explicação do modelo (R^2) igual a 0,750 e o teste F para a regressão indica que não há significância estatística

(pvalor>0,05). Entretanto, o teste F para a falta de ajuste resultou em um pvalor menor que 0,05 indicando que os resíduos da regressão são bem menores que o erro puro associado às repetições do ponto central de modo que uma nova regressão considerando apenas os efeitos significativos pode ser testado para o ajuste dos dados a fim de se reduzir os erros associados à falta de ajuste da regressão. Para tanto foi testado um modelo de 8 parâmetros excluindo-se o efeito quadrático de V e o efeito de interação entre S e T. A Figura 68 mostra o gráfico de Pareto e a Tabela 38 a análise de variância do modelo de 8 parâmetros.



FIGURA 68 - GRÁFICO DE PARETO DO MODELO DE 8 PARÂMETROS PARA A VARIÁVEL K (ATCC 55298)

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	v1	v_2	pvalor
Regressão	586345,6	7	83763,7				
Resíduo	205993,7	9	22888,2	3,7	7	9	0,04
Falta de Ajuste	204863,9	7	29266,3				
Erro Puro	1129,8	2	564,9	51,8	7	2	0,02
Total	792339,3	16					
Variação Explicada (R ²)		0,	740	Variação	Explicável	(R)	0,999

TABELA 38 - ANOVA DO MODELO DE 8 PARÂMETROS PARA A VARIÁVEL K (ATCC 55298)

A análise de variância para o modelo de 8 parâmetros para a resposta *k* por meio do teste F indica significância estatística tanto para a regressão quanto para a falta de ajuste.

O modelo codificado, portanto, é representado por:

$$k = 1587,08 + 46,16$$
. S - 35,51. S² - 66,92. V + 146,62. T - 99,81. T² + 43,88. S.V + 88,00. V.T

Para efeito comparativo desta análise da resposta k com as outras respostas que não apresentaram significância estatística para o modelo quadrático, cabe mostrar a estatística descritiva dos conjuntos de valores de k obtidos no ponto central e dos valores de k obtidos em todos os ensaios. A Figura 69 apresenta os Box Plot destes conjuntos de valores de k.



FIGURA 69 - BOX PLOT PARA OS VALORES DA RESPOSTA K (ATCC 55298)

A comparação dos dois gráficos evidencia que a variabilidade nos valores de k nas condições de ensaio no ponto central (erro puro) foi bem menor que a variabilidade decorrente do efeito dos fatores estudados de modo que a análise de variância apresentou significância estatística para os efeitos avaliados na resposta k. Uma vez que o a regressão retornou um modelo estatisticamente válido, pode-se, portanto, fazer uma da análise por meio das superfícies de resposta. A Figura 70 apresenta as superfícies de resposta para o índice de consistência (k) em função dos fatores estudados.



FIGURA 70 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA O ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA, K (ATCC 55298)

A análise das superfícies indica, portanto, que são obtidos maiores valores de k para a goma xantana produzida pela linhagem ATCC 55298 em temperaturas acima de 31° C (nível 1 da codificação) e concentração inicial de sacarose em torno de 25 g/l (nivel 0 da codificação). Quanto ao efeito da vazão de ar, a tendência observada na superfície de resposta plotada com o fator sacarose aponta para valores ótimos acima de 1,5 vvm enquanto que a superfície de resposta plotada com o fator sacarose aponto central (25° C) e baixa vazão (0,5 vvm) e outra de temperaturas acima de 30° C e vazão de ar acima de 1 vvm.

5.5.2.4.4 Otimização do processo utilizando a função desejabilidade

Para a otimização do processo em reator de bolha da linhagem ATCC 55298 utilizando a função desejabilidade, os dados obtidos no planejamento experimental foram ajustados ao modelo *spinline* (polinomial cúbico) para cada resposta $Y_{i,j} = f_i(X_1, X_2, X_3)$. Os parâmetros para o cálculo da função desejabilidade para cada resposta está apresentado na Tabela 39.

Description	d=0	d=0,5	d=1	Curv	atura
Kespostas -	Mínimo	Médio*	Máximo	S	t
Rendimento (%)	34	57	80	0,1	1,0
Concentração de Xantana (g/L)	8,2	10,8	13,5	0,1	1,0
Índice de consistência k (m.Pa.s ⁻¹)	1000	1500	2000	0,1	10

TABELA 39 - PARÂMETROS DA CURVA DE DESEJABILIDADE PARA CADA RESPOSTA (ATCC 55298)

*corresponde ao valor médio mais aceitável para o processo

A Figura 71 apresenta, nas primeiras três linhas e três colunas, o perfil de cada resposta Y_i em função de cada fator X_i isoladamente, na ultima coluna, apresenta a função desejabilidade d_i para cada resposta individualmente em função das respostas X_i e a ultima linha mostra o perfil da função desejabilidade global D para as três respostas em função do fator X_i mantendo-se os outros fatores no seu valor ótimo.



FIGURA 71 – PERFIL DAS RESPOSTAS E FUNÇÃO DESEJABILIDADE PARA CADA FATOR ESTUDADO (ATCC 55298)

O resultado da otimização utilizando a função desejabilidade, portanto, indica que as condições ótimas de processo de batelada repetida em reator de coluna bolha utilizando a linhagem ATCC 55298, dentro das restrições estabelecidas na Tabela 39 – Parâmetros da curva de desejabilidade para cada resposta (ATCC 55298), são concentração de sacarose de 33 g/L, vazão de ar de aproximadamente 1,8 vvm e temperatura de 33°C. A Figura 72 apresenta as curvas de contorno para a função desejabilidade global D em função dos fatores estudados mantendo-se o terceiro fator no seu ponto ótimo.



FIGURA 72 – CURVAS DE CONTORNO DA FUNÇÃO DESEJABILIDADE (ATCC 55298)

5.5.2.5 Resumo dos resultados obtidos nos ensaios do planejamento

A Tabela 40 apresenta os valores da média, desvio padrão, mínimo e máximo das respostas concentração de xantana 48h, rendimento, índice de consistência (k) e índice de comportamento de fluxo obtidos nos ensaios de otimização com as linhagens *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459*, ATCC 13951 e ATCC 55298.

Linhagam	Xantana 48h (g/L)				Rendimento (%)			
Linnagem	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo
NRRL B-1459*	8,8 ^a	1,1	7,1	11,5	38,8ª	6,3	29,9	51,9
ATCC 13951	10,8 ^b	1,9	7,7	14,6	48,6 ^b	14,3	27,7	86,0
ATCC 55298	11,1 ^b	1,6	8,2	13,4	50,5 ^b	11,7	34,2	80,1
Linhagam	$k \text{ (mPa.s}^{n})$				n			
Linnagem	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo
NRRL B-1459*	866ª	239	348	1269	0,34ª	0,033	0,30	0,40
ATCC 13951	1228 ^b	310	899	2035	0,29 ^b	0,022	0,24	0,32
ATCC 55298	1478 ^c	223	1053	1807	0,27 ^c	0,016	0,25	0,30

TABELA 40 – RESUMO DAS RESPOSTAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO COM CADA LINHAGEM

*letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05 pelo teste t)

Os dados da Tabela 40 mostram que as linhagens ATCC 13951 e ATCC 55298 apresentaram produtividade e rendimento médios similares, mas melhores quando comparados aos obtidos com a linhagem NRRL B1459^{*}. Em termos de qualidade do produto, *i.e.*, características reologicas da xantana, as amostras produzidas pela linhagem ATCC 55298 apresentaram, em média, melhor qualidade que as amostras produzidas pelas outras duas linhagens.

A Tabela 41 apresenta um resumo das condições ótimas para maximizar produtividade, rendimento e qualidade da goma xantana para cada linhagem conforme determinado com o uso da função desejabilidade.

Linhagem	Sacarose (g/L)	Temperatura (°C)	Vazão de ar (vvm)
NRRL B-1459 [*]	17-20	31	1
ATCC 13951	17-20	33	1-1,5
ATCC 55298	30-33	33	1,8

TABELA 41 - RESUMO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE OPERAÇÃO PARA MAXIMIZAÇÃO DAS RESPOSTAS

As condições apresentadas na Tabela 41 foram validadas experimentalmente somente para as linhagens ATCC 13951 e ATCC 55298 uma vez que a NRRL B-1459^{*} apresentou suspeita de degradação conforme discutido nas seções 4.1 e 0. Algumas modificações nestas condições foram feitas levando-se em conta os dados de literatura e o julgamento do processo baseado no "bom senso" na análise dos dados obtidos nos ensaios do planejamento.

Verificou-se que, independentemente das condições operacionais, o fermentado continha muita sacarose residual. O valor de 33 g/L de sacarose no mosto determinado como ótimo para maximizar as repostas do processo com a linhagem ATCC 55398 não condiz com a realidade observada nos experimentos. O valor da sacarose no mosto, portanto, foi fixada em 20 g/L nos ensaios de validação.

Adicionalmente, ao se manter constante a concentração inicial de sacarose no mosto, a variabilidade do rendimento em xantana é uma função somente da taxa de formação de produto. Outro aspecto que mereceu uma análise mais crítica foi o efeito da temperatura e aeração na qualidade do produto. A Figura 73 apresenta o perfil dos parâmetros reológicos ao longo dos ciclos obtidos nos ensaios do planejamento fatorial para a linhagem ATCC 13951.

A tendência observada nas quatro primeiras bateladas do 1º ciclo evidencia que os parâmetros reológicos melhoram em condições de maior temperatura e aeração. A batelada 2 foi caracterizada pelo binômio (aeração, temperatura) em (-1,-1) com baixo rendimento (27,7%) porém boa qualidade reológica do produto final. A baixa temperatura pode ter favorecido o crescimento microbiano em detrimento da formação de produto. De fato, Shu e Yang (1989) relataram que temperaturas na faixa de 24-27°C favorecem o crescimento de biomassa e temperaturas entre 27-30°C favorecem a formação de xantana.



FIGURA 73 – PERFIL DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS AO LONGO DOS CICLOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL (ATCC 13951)

O 2° ciclo é caracterizado por um binômio (aeração, temperatura) não sinérgico com as seguintes combinações codificadas (-1,1), (1,-1), (0,0) e (-1,1) da batelada 9 à 12, respectivamente, resultando em qualidade reológica inferior do produto final quando comparada com as bateladas 1-4. O 3° ciclo iniciou o binômio (aeração, temperatura) em (1,-1), prosseguiu com valores medianos (0,0) e (0,0) nas bateladas 14 e 15, teve uma combinação sinérgica (1,1) que não apresentou melhores parâmetros reológico que as demais e terminou em condições de baixa vazão e temperatura mediana (-1,68,0).

A variabilidade encontrada nas bateladas que operaram nas condições do ponto central foi grande e, provavelmente, reflete a variabilidade na concentração inicial de biomassa bem como ao tempo em que esta biomassa está reciclando no sistema. Peters *et al.* (1993) relatou que a massa molecular do polissacarídeo tende a aumentar com o aumento da taxa específica de crescimento e a melhora dos parâmetros reológicos observada no ensaio preliminar, em que o reciclo da biomassa foi feito em condições operacionais fixas, ratifica esta tendência.

Outra fonte de variabilidade na qualidade do produto final poderia ser a concentração final de biomassa, uma vez que, neste trabalho, a xantana foi recuperada do caldo sem separação das células, *i.e.*, xantana grau industrial. Kennedy *et al.* (1982), trabalhando com fontes complexas de nitrogênio (peptona, água de maceração de milho, extrato de levedura) para produção de xantana grau industrial, atribuiu a grande variabilidade reológica das amostras (0,27 < n < 0,86 e 21,5 < k < 2880 mPa.sⁿ para solução aquosa 0,5% p/v) tanto à presença de células quanto aos resíduos das fontes complexas utilizadas.

A Figura 74 apresenta o perfil dos parâmetros reológicos ao longo dos ciclos obtidos nos ensaios do planejamento fatorial para a linhagem ATCC 55298.



FIGURA 74 – PERFIL DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS AO LONGO DOS CICLOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL (ATCC 55298)

O perfil dos parâmetros reológicos das amostras de xantana produzida pela linhagem ATCC 55298 também indica que baixas temperaturas (<28°C) levam a produção de um polissacarídeo com qualidade reológica inferior. A operação na temperatura de 33°C, entretanto, parece não ter tido efeito positivo nos parâmetros reológicos, sugerindo que essa não é uma temperatura adequada, conforme apontado pela otimização utilizando a função desejabilidade. O efeito da aeração na qualidade da goma, por outro lado, não foi tão pronunciado, estando de acordo com a análise por meio de superfície de resposta. Observase também que a variabilidade dos parâmetros reológicos das amostras obtidas nas bateladas 1, 3 e 15, que operaram nas condições do ponto central, foi menor que a observada para a linhagem ATCC 13951.

5.5.3 Ensaios de validação

Os ensaios de validação dos resultados obtidos na otimização foram feitos somente para as linhagens ATCC 13951 e ATCC 55298. O número de bateladas nos ciclos variaram de 2 a 5 devido tanto a contaminação do sistema quanto a problemas operacionais, como ruptura de mangueira ou formação de espuma vigorosa levando ao arraste de fermentado para o Erlenmeyer ("tanque pulmão"). A concentração de sacarose foi mantida em 20 g/L no mosto de alimentação mas sofreu diluição variada ao longo das bateladas em cada ciclo inerente ao processo de bateladas repetidas. As condições de operação, temperatura e vazão de ar, foram testadas tanto para os valores determinados com a função desejabilidade quanto em outras condições que foram julgadas apropriadas para maiores investigações.

5.5.3.1 Validação com a linhagem ATCC 13951

Os ensaios de validação com a linhagem ATCC 13951 foram conduzidos em 3 ciclos: (1°) bateladas 1 a 4 – interrompido por vazamento –, (2°) bateladas 5 a 8 – interrompido por vazamento –, e (3°) bateladas 9 a 10 – interrompido por contaminação. Na batelada 3 do 1° ciclo, houve vazamento de aproximadamente 100-120 ml de fermentado porém a batelada não foi interrompida: o Erlenmeyer ("tanque pulmão") foi trocado e a amostragem das 24h foi feita com parte do fermentado que vazou. Os perfis cinéticos de cada batelada destes 3 ciclos estão apresentados na Figura 75.



FIGURA 75 - PERFIL CINÉTICO DE CADA CICLO NO ENSAIO DE VALIDAÇÃO (ATCC 13951)

139

O perfil cinético de cada batelada foi desenhado com somente 3 pontos (0h, 24h e 48h), o que não é uma prática adequada quando se quer quantificar dados cinéticos. Este número reduzido de amostragens foi decorrente do reduzido volume do reator (600ml) que foi limitado ao tamanho da autoclave e da necessidade de se ter uma quantidade de fermentado ao final de cada batelada suficiente para se recuperar goma xantana para realizar o ensaio de determinação dos parâmetros reológicos. Os perfis apresentados na Figura 75, entretanto, fornecem dados qualitativos sobre o sistema em estudo.

De uma maneira geral, observa-se que a formação de produto está associada ao crescimento, a taxa de formação de biomassa é maior nas primeiras 24h, quando não há limitação da fonte de nitrogênio, e a curva de crescimento microbiano só atinge o estado estacionário por volta das 48h de fermentação. A taxa formação de produto também foi maior nas primeiras 24h, com exceção da batelada 3, que será comentada mais adiante. A taxa de consumo de substrato sofreu pouca variação ao longo das bateladas apresentando pequena redução após 24h em algumas bateladas, provavelmente devido à menor demanda microbiana para formação de biomassa nas culturas quando já se atingia a fase estacionária.

Os efeitos das condições operacionais ficaram mais evidentes nas primeiras 24 horas em que uma aeração mais vigorosa de 1,5-2 vvm acelerou a taxa de crescimento do microrganismo bem como a formação de produto conforme relatado por Papagianni *et al.* (2001). A temperatura de 33°C usada na batelada 8 não foi adequada para a produção de goma embora tenha apresentado perfil cinético similar às outras. Outras bateladas foram conduzidas com a temperatura de 33°C cujos resultados não foram mostrados porque houve vazamento do fermentado devido a intensa formação de espuma. Casas *et al.* (2001) relataram que a temperatura de 34°C não foi adequada para a produção de xantana e a operação na temperatura de 31°C apresentou menor produção de goma quando comparada com a operação a 28°C em reator de mistura. Esta melhor performance a 28°C relatada por Casas *et al.* (2001), entretanto, ocorreu certamente pela maior agitação aplicada nesta temperatura que a 31°C.

Observa-se ainda, na Figura 79, que a taxa de consumo de substrato e a taxa de formação de goma apresentam nítida correlação linear conforme observado por Schweickart e Quilan (1989), que verificaram que a formação do produto tem como substrato limitante a fonte de carbono e a formação de biomassa tem como substrato

limitante a fonte de nitrogênio e que estas relações obedecem a uma cinética de Monod "quasi-estequiométrica" com valores de $Y_{Xantana/Glicose}$ e $Y_{Biomssa/Nitrogênio}$ de aproximadamente 0,51 e 5,0 respectivamente.

Como já comentado, no presente trabalho, quantificou-se a xantana bruta de modo que alguns valores de $Y_{Xantana/Sacarose}$ calculados foram maiores 1. Para se ter valores comparativos com a literatura, foi definido o rendimento $Y_{X/S}^*$ como o rendimento corrigido $Y_{(Xantana -Biomassa)/Sacarose}$, em que foi descontada da massa xantana bruta quantificada a massa celular formada. Esta correção considerou que toda a biomassa foi carreada junto com a goma na precipitação com etanol. Neste ensaio de validação, obtevese uma média de $0,57\pm0,09$ para $Y_{X/S}^*$ nos dois ciclos cujo valor está próximo aos valores obtidos por Schweickart e Quinlan (1989) utilizando processo de batelada de 72 a 120 horas e reator de mistura. A Figura 76 apresenta os dados obtidos para o rendimento (R) e $Y_{X/S}^*$ para cada batelada.



FIGURA 76 - RENDIMENTO E Y^{*}_{X/S} DE CADA BATELADA DO ENSAIO DE VALIDAÇÃO (ATCC 13951)

O efeito da concentração inicial de xantana fica evidente quando se observa a evolução da variável $Y^*_{X/S}$ ao longo dos ciclos. Particularmente, a redução de $Y^*_{X/S}$ da batelada 1 para a batelada 2 (31°C e 1 vvm) e da batelada 9 para a batelada 10 (31°C e 1,5 vvm) é um reflexo da maior quantidade de biomassa no tempo 0h que, somada à disponibilidade de nitrogênio no meio, levou a um desvio do consumo de sacarose para a formação de biomassa em detrimento da formação de xantana. O rendimento global,

entretanto, não foi prejudicado uma vez que a concentração inicial de xantana também foi maior nas bateladas subseqüentes à primeira batelada de cada ciclo. Este efeito do desvio do consumo de sacarose para produção de biomassa não foi observado entre as bateladas 5 e 6 devido a uma menor taxa de crescimento celular na batelada 6. Estes eventos podem ser melhor visualizados na Figura 77 que apresenta os perfis da concentração de xantana, sacarose e biomassa nos tempos 0h, 24h e 48h ao longo dos ciclos e os parâmetros reológicos do caldo fermentado obtido após 48h em cada batelada.

O primeiro ciclo operou com temperatura constante em 31°C e houve somente mudança na vazão de ar de 1 vvm para 1,5 vvm da batelada 2 para a batelada 3. O aumento da aeração na batelada 3 provocou arraste de grande volume de fermentado nas primeiras 24 horas. Verifica-se que a concentração de biomassa aumentou bastante no intervalo de 0h para 24h, mas permaneceu praticamente constante das 24h até as 48h quando houve conversão de grande parte da sacarose residual em xantana. A concentração final de xantana na batelada 3 foi de 14,9 g/L contra uma média de 11,9 g/L das bateladas que operaram nas mesmas condições (4, 5, 6, 9 e 10). Esta batelada pode ser considerada um ponto *outlier* do sistema em estudo e interessante para análise que será apresentada mais adiante.

O segundo ciclo operou a temperatura de 31°C e 1,5 vvm, com exceção da batelada 7 que operou com 2 vvm. Nesta batelada, observa-se que houve maior formação de biomassa nas primeiras 24h bem como maior formação de produto, indicando que o aumento da aeração contribuiu na melhora dos fenômenos de transferência de massa de oxigênio, gás carbônico e nutrientes. Este efeito foi comprovado com a redução da vazão para 1,5 vvm na batelada seguinte. O terceiro ciclo operou nas condições padrão de 31°C e 1,5 vvm apresentando perfil similar as bateladas que operaram nas mesmas condições.

Quanto a batelada 3 a alta taxa de formação de biomassa nas primeiras 24h pode ser explicada pela existência de um leito de espuma acima da fase líquida que levou a uma melhor disponibilidade de oxigênio para as células. Segundo Prins evan't Riet (1987), espumas são caracterizadas por ser uma dispersão não uniforme de gás em um pequeno volume de líquido. Stevenson *et al.* (2008) apresentam uma teoria do mecanismo hidrodinâmico de uma espuma fazendo uma analogia com uma coluna de destilação: as bolhas formadas na interface líquido-espuma representam o primeiro estágio e a drenagem de líquido no topo, gerada pela coalescência das bolhas, gera uma corrente de refluxo interna. Este fenômeno de drenagem e coalescência das bolhas numa espuma foi também estudado por Maurdev *et al.* (2006). Embora os pesquisadores tenham sido motivados a estudar este fenômeno para uso na recuperação de proteínas por enriquecimento da espuma, esta teoria pode ser útil para explicar o que ocorreu na batelada 3.

Nas fermentações realizadas no reator de coluna de bolha, sempre havia formação de espuma e foi observado que, em todo leito de espuma e não somente no topo, havia constante ruptura e coalescência das bolhas de modo que o fermentado era reciclado entre as duas fases do sistema conforme relatado por Maurdev *et al.* (2006). Este equilíbrio dinâmico de formação de correntes ascendentes, que saiam da interface líquido-espuma para a fase espuma, e descendentes, que retornavam do leito de espuma através do filme líquido à fase líquida, permitia também a homogeneização do meio e acesso aos nutrientes ainda disponíveis na fase líquida. Aliado a esta dinâmica, obviamente, a área superficial de troca das bolhas de ar é muito maior na fase espuma do que na fase líquida e a espessura fina do filme líquido na espuma diminui a contribuição do *bulk* do líquido na resistência à transferência de oxigênio, resultando em uma maior disponibilidade de oxigênio para as células suspensas na espuma.

A existência da fase espuma, portanto, constituiu em uma vantagem nesta batelada aumentando a taxa específica de crescimento celular nas primeiras 24h e uma maior conversão de sacarose em xantana a partir das 24h quando, o esgotamento da fonte de nitrogênio, favoreceu a transformação de substrato em produto e não biomassa. A reduzida quantidade de antiespumante utilizada nesta batelada também constitui em fator favorável para a melhora dos fenômenos de transferência uma vez que o antiespumante não só elimina a espuma, mas também provoca a coalescência das bolhas na fase líquida reduzindo a razão superfície/volume conforme apresentado por Al-Masry (1999) e Prins e van't Riet (1987).



FIGURA 77 – PERFIS DA CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA, DE XANTANA E DE SACAROSE NOS TEMPOS 0H, 24H E 48H EM FUNÇÃO DE CADA BATELADA AO LONGO DOS CICLOS (ENSAIO DE VALIDAÇÃO - ATCC 13951)

A Figura 78 apresenta o perfil da concentração final de xantana (48h) e dos parâmetros reológicos do caldo fermentado e da xantana recuperada ao final de cada batelada ao longo dos ciclos. A variabilidade dos valores dos parâmetros n e k do caldo fermentado (Figura 78 (B)) estão associados à variabilidade na concentração de xantana no caldo (Figura 78 (A)) bem como à qualidade da goma xantana produzida (Figura 78 (C)).

O perfil dos parâmetros $n \in k$ do caldo fermentado (Figura 78 (B)) apresentam variações ao longo do ciclo seguindo o padrão da variação da concentração de xantana no mesmo, *i.e.*, quanto maior a concentração de xantana no caldo menor o valor de n e maior o valor de k. Esta tendência está de acordo com o reportado na literatura de aumento da viscosidade de soluções de xantana como aumento da concentração (Xuewu *et al.*, 1996; Milas *et al.*, 1985). Esta tendência, entretanto, não ocorreu no 3º ciclo em que o fermentado produzido na batelada 10, apesar de ter apresentado maior concentração de goma (Figura 78 (A)), apresentou valor do índice de consistência inferior ao do produzido na batelada 9 (Figura 78 (B)). A análise reológica da goma recuperada evidencia que goma produzida na batelada 10 tinha qualidade inferior à produzida na batelada 9 justificando o desvio.

Os valores dos parâmetros $n \in k$ das amostras de xantana obtidas no ensaio de validação estão inferiores (595±78 mPa.sⁿ) aos valores determinados para as amostras obtidas nos ensaios do planejamento experimental (1228±310 mPa.sⁿ). A explicação para este fato está na maior quantidade de antiespumante utilizada nestes ensaios que operaram com vazão de ar acima de 1 vvm, tendo a maioria operado com 1,5 vvm.

Em todas as bateladas do ensaio de validação, foi necessário utilizar muito antiespumante devido à intensa formação de espuma. A adição do antiespumante não tinha um controle quantitativo de modo que uma quantidade muitas vezes além da necessária era adicionada. Muitas vezes, quando já se tinha uma massa considerável de xantana no fermentado, a gota de antiespumante adicionada era envolvida por uma camada de goma perdendo sua ação tensoativa permanecendo no fermentado na forma de uma pequena esfera, sendo retirado antes do tratamento térmico. Mesmo após etapa de recuperação, a goma apresentava muito resíduo de antiespumante que ficava visível quando a amostra era solubilizada para análise reológica. A presença de antiespumante em grande quantidade no fermentado, portanto, comprometeu a qualidade do produto final.



FIGURA 78 - PERFIS DA CONCENTRAÇÃO DE GOMA XANTANA 48H (A), DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS DO FERMENTADO 48H (B) E DA GOMA XANTANA RECUPERADA (C) EM FUNÇÃO DE CADA BATELADA AO LONGO DOS CICLOS (ENSAIO DE VALIDAÇÃO - ATCC 13951)

A Tabela 42 apresenta um resumo comparativo das respostas obtidas nos ensaios de otimização e nos ensaios de validação.

Fonte dos	Xantana 48h (g/L)				Rendimento (%)			
Dados	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo
Validação	12,5ª	1,3	10,9	14,9	72,5ª	9,5	61,7	86,5
Otimização	10,8 ^b	1,9	7,7	14,6	48,6 ^b	14,3	27,7	86,0
	k (mPa.s ⁿ)				n			
Linnagem	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo
Validação	595ª	74	437	697	0,36ª	0,01	0,34	0,37
Otimização	1228 ^b	310	899	2035	0,29 ^b	0,02	0,24	0,32

TABELA 42 – COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO E NOS ENSAIOS DE VALIDAÇÃO (ATCC 13951)

*letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05 pelo teste *t*)

A média dos valores da concentração final de xantana e a média dos valores de rendimento obtidos nos ensaios de validação foram maiores que os obtidos nos ensaios de validação. A comparação dos parâmetros reológicos, no entanto, não pode ser considerada devido aos problemas já mencionados a respeito da quantidade excessiva de antiespumante utilizada nos ensaios de validação. A condição de operação em 31°C e 1,5 vvm mostrou-se a mais adequada em termos de rendimento e produtividade.

5.5.3.2 Validação com a linhagem ATCC 55298

Os ensaios de validação com a linhagem ATCC 55298 foram conduzidos em 2 ciclos conforme planejamento inicial, com ocorrência de vazamento de fermentado em algumas bateladas por formação excessiva de espuma mas que não acarretaram necessidade de parada do ciclo: (1°) bateladas 1 a 5 e (2°) bateladas 6 a 12. Os perfis cinéticos de cada batelada destes 3 ciclos estão apresentados na Figura 79.

Mais uma vez cabe ressaltar que o perfil cinético de cada batelada foi desenhado com somente 3 pontos (0h, 24h e 48h), não sendo adequado para quantificar parâmetros porém os perfis fornecem dados qualitativos sobre o sistema em estudo.



A vazão e a temperatura no 1º ciclo foram mantidos constantes em 1 vvm e 31°C. O 2° ciclo operou em condições variadas iniciando na condição de 31°C e 1 vvm que apresentou perfil cinético similar ao das bateladas do 1º ciclo. As bateladas 7 e 8 operaram em 33°C e 2 vvm. Nestas bateladas, a alta vazão de ar provocou arraste de água que condensava no Erlenmeyer (tanque pulmão) e intensa formação de espuma. A cinética da batelada 7, apesar da mudança das condições de vazão e temperatura, não variou muito em comparação com as bateladas 1 a 6 bem os valores de rendimento e concentração final de xantana variaram pouco. A batelada 8 apresentou vazamento de metade do fermentado, evento similar ao ocorrido com a batelada 3 do ensaio de validação com a linhagem ATCC 13951, e será comentada mais adiante. As bateladas 9 e 10 operaram em 29°C e 1 vvm e a batelada 9 apresentou a taxa consumo de sacarose visivelmente inferior porém sem redução na taxa de formação de xantana. As bateladas 11 e 12 operaram em 31°C e 1,5 vvm e o perfil cinético evidencia uma maior taxa de consumo de sacarose e de produção de xantana quando comparadas com as bateladas 1 a 5 que operaram nas mesmas condições de temperatura mas com aeração inferior (1 vvm). Este resultado indica que o aumento da aeração levou a uma melhora na transferência de oxigênio e agitação estando de acordo com o relatado por Pons et al. (1990) que obtiveram melhor performance na produção de xantana em reator de coluna de bolha operando com aeração de 1,5 vvm do que com 1 vvm.

Observa-se ainda, na Figura 79, que a taxa de consumo de substrato e a taxa de formação de goma apresentam nítida correlação linear conforme observado por Schweickart e Quilan (1989), que verificaram que a formação do produto tem como substrato limitante a fonte de carbono e a formação de biomassa tem como substrato limitante a fonte de nitrogênio e que estas relações obedecem a uma cinética de Monod "*quasi*-estequiométrica" com valores de $Y_{Xantana/Glicose}$ e $Y_{Biomssa/Nitrogênio}$ de aproximadamente 0,51 e 5,0 respectivamente.

Como já apresentado, no presente trabalho, foi definido o rendimento $Y^*_{X/S}$ como o rendimento corrigido $Y_{(Xantana -Biomassa)/Sacarose}$, em que foi descontada da massa xantana bruta quantificada a massa celular formada. Esta correção considerou que toda a biomassa foi carreada junto com a goma na precipitação com etanol. Neste ensaio de validação, obteve-se uma média de 0,82±0,18 para $Y^*_{X/S}$ nos dois ciclos cujo valor está próximo aos valores obtidos por Yang *et al.* (1996) utilizando um reator com células imobilizadas em

um leito fixo fibroso operando com processo de batelada repetida de 24 a 40 horas de duração. A Figura 80Figura 80 apresenta os dados obtidos para o rendimento (R) e $Y^*_{X/S}$ para cada batelada.



FIGURA 80 – RENDIMENTO E Y^{*}_{X/S} de cada batelada do ensaio de validação (ATCC 55298)

As bateladas 7 e 8 apresentaram os maiores valores para $Y^*_{X/S}$, que embora maiores que 1 pelos motivos já apontados, indicam que alta vazão e temperatura favorecem a formação de xantana estando de acordo com o relatado por Pons *et al.* (1989) e Shu e Yang (1989). O rendimento global (R) sofreu pouca variação tendo sido menor nas bateladas 9, pela alta sacarose residual, e 10, certamente pela menor temperatura de operação favorecendo.

A Figura 81 apresenta o perfil da concentração de xantana, sacarose e biomassa nos tempos 0h, 24h e 48h ao longo dos ciclos. Como pode ser observado no 1° ciclo houve variabilidade significativa na concentração de biomassa nos tempos 24h e 48h de fermentação embora, no tempo 0h a variabilidade tenha sido menor, excetuando-se a primeira batelada que foi inoculada com cultura crescida em *shaker* a partir de criotubos. A concentração de xantana no tempo 48h, entretanto, sofreu pouca variação bem como o rendimento conforme apresentado na Figura 80 e Figura 81, respectivamente.



FIGURA 81 - PERFIS DA CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA, DE XANTANA E DE SACAROSE NOS TEMPOS 0H, 24H E 48H EM FUNÇÃO DE CADA BATELADA AO LONGO DOS CICLOS (ENSAIO DE VALIDAÇÃO - ATCC 55298)

A batelada 8 apresentou vazamento de metade do fermentado entre 24h e 48h de fermentação e maior produção de goma ao final de 48h quando comparada às demais. Houve pouco crescimento celular nas primeiras 24 horas (a causa desta inibição não foi determinada) seguido de vigoroso crescimento celular bem como alta taxa de formação de produto acompanhado da formação do leito de espuma e arraste de fermentado. Estes eventos foram muito similares aos ocorridos com a batelada 3 do ensaio de validação da linhagem ATCC 13951 sendo que o efeito da formação do leito de espuma foi evidenciado no intervalo entre 24h e 48h de fermentação. As mesmas considerações feitas acerca da dinâmica do leito de espuma valem também para explicar uma concentração de xantana (15,6 g/L) obtida na batelada 8 quando comparada às demais.

As bateladas 11 e 12 apresentaram maior concentração final de xantana, 14,77 e 14,14 g/L respectivamente, provavelmente devido um ganho em biomassa superior nas primeiras 24h quando comparada às demais, resultando em uma maior conversão de glicose em xantana no intervalo seguinte (24h a 48h). Este ganho em formação de biomassa e xantana, conforme já comentado, indica que o aumento da aeração para 1,5 vvm levou a uma melhora na transferência de oxigênio e agitação no reator.

O perfil da concentração final de xantana (48h) e dos parâmetros reológicos do caldo fermentado e da xantana recuperada ao final de cada batelada ao longo dos ciclos estão apresentados na Figura 82. Similarmente ao dissertado anteriormente, os valores dos parâmetros n e k do caldo fermentado (Figura 82Figura 82 (B)) é uma soma da contribuição da concentração de xantana no caldo (Figura 82 (A)) e da qualidade da xantana produzida Figura 82 (C)).

O perfil dos parâmetros $n \in k$ do caldo fermentado (Figura 82Figura 82 (B)) apresentam grandes variações ao longo do 1º ciclo seguindo mais pronunciadamente o perfil dos parâmetros reológicos da goma (Figura 82 (C)), uma vez que a concentração de xantana no caldo fermentado apresentou menor variabilidade. Somente a batelada 4 apresentou desvio desta tendência possivelmente pelo efeito de excesso de antiespumante no fermentado. O fermentado produzido nas bateladas 2 e 5 também continham bastante antiespumante que foi igualmente carreado para a goma na recuperação conforme foi observado durante a execução das análises. A grande variabilidade reportada neste 1º ciclo, portanto, foi causada pela presença da adição não controlada do antiespumante conforme já comentado. No 2° ciclo, a sinergia entre a concentração *versus* a qualidade da goma xantana nos parâmetros reológicos do fermentado também é evidente. O fermentado produzido na batelada 6 apresentou melhores parâmetros reológicos que o produzido nas bateladas 7 e 8 que apresentaram maior concentração de xantana porém com qualidade reológica inferior. Esta qualidade reológica inferior, no entanto, foi devido ao excesso de antiespumante utilizado na batelada 7 que operou com aeração de 2 vvm. Este excesso se propagou para a batelada 8 que utilizou parte do fermentado da batelada 7 como inóculo. As duas bateladas seguintes que operaram com aeração de 1 vvm não necessitaram de uso excessivo de antiespumante emboraum pouco de fermentado tenha vazado na batelada 9.

Os valores dos parâmetros n e k das amostras de xantana obtidas no ensaio de validação estão inferiores (676±174 mPa.sⁿ) aos valores determinados para as amostras obtidas nos ensaios do planejamento experimental (1478±223 mPa.sⁿ). A explicação para este fato está na maior quantidade de antiespumante utilizada nestes ensaios que operaram com vazão de ar acima de 1 vvm e temperaturas superiores a 29°C. As mesmas considerações feitas acerca dos problemas relacionados à falta de controle na adição do antiespumante que ocorreram nos ensaios de validação com a linhagem ATCC 13951 valem a linhagem ATCC 55298. Muitas das amostras de xantana mesmo após recuperação e secagem apresentavam quantidade significante de óleo originado do antiespumante.



FIGURA 82 - PERFIS DA CONCENTRAÇÃO DE GOMA XANTANA 48H (A), DOS PARÂMETROS REOLÓGICOS DO FERMENTADO 48H (B) E DA GOMA XANTANA RECUPERADA (C) EM FUNÇÃO DE CADA BATELADA AO LONGO DOS CICLOS (ENSAIO DE VALIDAÇÃO - ATCC 55298)

A Tabela 43 apresenta um resumo comparativo das respostas obtidas nos ensaios de otimização e nos ensaios de validação.

Fonte dos Dados	Xantana 48h (g/L)				Rendimento (%)			
	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo
Validação	12,9ª	1,5	11,1	15,6	70,1ª	8,3	55,8	81,6
Otimização	11,1 ^b	1,6	8,2	13,4	50,5 ^b	11,7	34,2	80,1
Linkson	$k \text{ (mPa.s}^{n})$				п			
Linnagem	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo	Média*	DesvPad	Mínimo	Máximo
Validação	676ª	174	381	938	0,35ª	0,04	0,31	0,41
Otimização	1478 ^b	223	1053	1807	0,27 ^b	0,02	0,25	0,30

TABELA 43 – COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS OBTIDAS NOS ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO E NOS ENSAIOS DE VALIDAÇÃO (ATCC 55298)

*letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05 pelo teste *t*)

A média dos valores da concentração final de xantana e a média dos valores de rendimento obtidos nos ensaios de validação foram maiores que os obtidos nos ensaios de validação. A comparação dos parâmetros reológicos, no entanto, não pode ser considerada devido aos problemas já mencionados a respeito da quantidade excessiva de antiespumante utilizada nos ensaios de validação.

A média da concentração de xantana e do rendimento nas bateladas 1 a 5 que operaram a 31°C e 1 vvm foi de 12,2 \pm 0,7 g/L e 68,5 \pm 3,7% contra médias 14,4 \pm 0,4 g/L e 78,5 \pm 2,1% obtidas nas bateladas 11 e 12 que operaram a 31°C e 1,5 vvm. Portanto, as condições de operação mais adequadas para maximização da concentração final de xantana e de rendimento são 31°C e 1,5 vvm para a linhagem ATCC 55298.

5.6 Produção de xantana por processo de batelada repetida (piloto)

Os ensaios em planta piloto foram realizados com a linhagem NRRL B-1459^{*} em paralelo com os ensaios em escala de laboratório. Os dois primeiros ensaios realizados na planta piloto apresentaram problemas de contaminação na segunda batelada do ciclo conforme apresentado na Tabela 44.

Batelada/Ciclo	Inóculo	Tempo (h)	Rendimento (%)	Xantana (g/L)	Observações
01/05	Garrafão 24h após inoculação	66	54	16,3	Normal
02/02	Corte da 01/01 10 %Nível	72	24	7,2	Contaminada por bacilos
01/02	Garrafão 24h após inoculação	68	72	17,6	Normal
02/02	Corte da 01/02 8,6 %Nível	89	62	18,5	Contaminada por bacilos

TABELA 44 – DADOS DAS BATELADAS 01/01 A 02/02

Para efeito de avaliação do processo, foi desenhado o perfil cinético das bateladas 01/01 e 01/02. Os perfis da concentração de xantana, de sacarose e de biomassa das bateladas 01/01 e 01/02 estão apresentados na Figura 83.



FIGURA 83 - PERFIL CINÉTICO DAS BATELADAS 01/01 E 01/02

Na batelada 01/01, a aeração foi mantida em 1 vvm e foi observado que houve uma ligeira diminuição na velocidade de consumo de sacarose e na taxa de formação de xantana e biomassa a partir de 24 horas de fermentação certamente pela redução na taxa de transferência de oxigênio devido a alta concentração de goma (10g/L). Por este motivo, na batelada 01/02, decidiu-se aumentar a aeração a cada amostragem para observar a resposta do sistema. Adicionalmente, foi reduzida a quantidade inicial de sacarose uma vez que restou bastante sacarose ao final da fermentação.

O resultado da aeração em degrau aplicada na batelada 01/02 foi bastante satisfatório pois se conseguiu manter a taxa de consumo de sacarose, formação de xantana e biomassa praticamente constante durante toda a fermentação. Em termos de rendimento global (Sacarose inicial / Xantana final), houve um incremento significativo de 18%. Na batelada 01/02, praticamente toda a sacarose foi consumida e o rendimento $Y_{x/s}$ (xantana produzida por sacarose consumida) foi de 84%.

O terceiro ciclo iniciou com uma cultura totalizando 48 horas de incubação no garrafão por causa de atraso no preparo do reator para iniciar a batelada. A batelada 01/03, portanto, foi inoculada com uma cultura que, provavelmente, já estava em fase exponencial de morte. Ainda assim, esta primeira batelada apresentou bons resultados. A partir desta batelada, foram feitos cortes consecutivos no reator em que aproximadamente 10% do fermentado era deixado no reator para servir de inóculo para a batelada seguinte. Chegou-se ao final da batelada 06/03 totalizando 25 dias de operação da planta piloto e 6 bateladas consecutivas de aproximadamente 90 horas e ausência de contaminação no fermentado. A Tabela 45 apresenta o histórico das bateladas consecutivas e algumas características de cada batelada e os perfis cinéticos das bateladas estão apresentados na Figura 84.

Batelada/ Ciclo	Origem	Tempo (h)	Rendimento (%)	Xantana (g/L)	Y _{B/S}	Y [*] _{X/S}
01/03	Garrafão 48h após inoculação	112	40	15,5	0,10	0,56
02/03	Corte da 01/03 10 %N	88	47	22,4	0,17	0,71
03/03	Corte da 02/03 10 %N	90	68	27,3	0,16	0,67
04/03	Corte da 03/03 10 %N	86	65	25,8	0,32	0,63
05/03	Corte da 04/03 10 %N	93	27	15,2	0,23	0,16
06/03	Corte da 05/03 10 %N	93	30	14,8	0,21	0,15

TABELA 45 - DADOS DAS BATELADAS 01/03 A 02/03



--Sacarose --Xantana --Biomassa --Aeração

FIGURA 84 - PERFIL CINÉTICO DAS BATELADAS 01/03 A 06/03

158

A batelada 01/03 iniciou com uma concentração de células muito baixa e a curva de crescimento microbiano apresentou uma fase *lag* de aproximadamente 20 horas. Observa-se que, após 40 horas de fermentação, há um declínio da taxa de produção de xantana, bem como na taxa de consumo de sacarose, e o crescimento microbiano atinge a fase estacionária. Mesmo após um aumento na aeração para 1,5 vvm, estas taxas continuaram declinando indicando agitação e oxigenação pobres. A concentração de xantana em 48h atingiu valor aproximadamente 15 g/L superior aos resultados obtidos em escala de laboratório indicando que o escalonamento melhorou os fenômenos de transferência de oxigênio provavelmente pelo maior tempo de residência das bolhas de ar no reator piloto que aumentou cerca de 10 vezes.

Na batelada 01/02, a taxa de crescimento celular atingiu a fase estacionária a partir da 20 horas e, após aumento da aeração em duas vezes, houve leve aumento na biomassa. Este incremento da aeração aumentou também a velocidade de consumo de sacarose bem como a produção de xantana. A concentração final de xantana nesta batelada atingiu um valor de 22,4 g/L em 88h.

Nas batelada 03/03, aplicou-se uma aeração em degrau com incremento de 0,5 vvm a cada 24 horas. O sistema reagiu similarmente ao observado com a batelada 02/02: as taxas de consumo de sacarose e de produção de xantana permaneceram praticamente constantes em 0,27 e 0,22 g/L.h respectivamente. A taxa de crescimento microbiano, entretanto, certamente por limitação da fonte de nitrogênio, reduziu significativamente ao longo do tempo. A concentração final de xantana foi a maior do ciclo chegando a 27,3 g/L e rendimento de 68%. A batelada 04/03 apresentou perfil similar a batelada 03/03 mas apresentou rendimento (65%) e concentração final de xantana (25,8 g/L) ligeiramente menores. O rendimento em biomassa por substrato $Y_{B/S}$ foi bem superior ao das bateladas anteriores provavelmente devido a maior concentração de biomassa na hora zero. O perfil cinético destas duas bateladas bem como os valores obtidos para rendimento e concentração final de xantana em escala piloto utilizando batelada simples e reator de mistura com agitação em degrau variando de 200 a 650 rpm com diferentes tipos de impelidores.

Nas bateladas 05/03 e 06/03, observam-se redução na taxa de formação de xantana e aumento na taxa de formação de biomassa. Apesar de estas bateladas terem iniciado com uma concentração maior de biomassa, esta não foi a única causa deste aumento. A mudança no padrão metabólico da linhagem nestas bateladas é evidente ao se comparar os valores de $Y_{B/S}$ e $Y_{X/S}^*$ destas bateladas com a batelada 01/03 que atingiu praticamente a mesma concentração de xantana ao final da fermentação. Esta mudança pode ser mais um indicativo da degradação da linhagem NRRL B-1459^{*}.

Os resultados da análise reológica das gomas produzidas nestas bateladas foi muito ruim e a causa desta degradação da goma não foi detectada. Certamente o problema não foi no processo, pois o fermentado apresentava-se bastante viscoso carreando consigo muitas e pequenas bolhas de ar. Uma possível causa pode ter sido contaminação por algum bacilo capaz de degradar a goma conforme relatado por Cadmus *et al.*, 1982 ou um tratamento térmico deficiente incapaz de inativar endocelulases originadas da própria *Xanthomonas campestris*, conforme relatado por Shöter *et al.* (2001). De fato, a autoclave disponível na usina estava sem a borracha de vedação apresentando vazamento de vapor.

Os resultados obtidos em escala piloto indicam que para se atingir alto rendimento e produtividade é necessária a aplicação de uma aeração vigorosa e iniciar a batelada com uma concentração de células relativamente elevada. A aeração de 1,5 vvm determinada como ótima para as bateladas de 48 horas conduzidas em escala de laboratório não foi adequada para operação de bateladas de 90 horas em escala piloto. A aplicação de uma aeração em degrau mostrou ser mais adequada para contornar os problemas de diminuição na taxa de transferência de oxigênio decorrente do aumento gradual da viscosidade do caldo fermentado, que em escala piloto, atingiu maiores valores de concentração de xantana certamente devido ao maior tempo de fermentação.

6 Conclusões

O processo por bateladas repetidas em escala de laboratório mostrou-se adequado para a produção de goma xantana. Os efeitos da concentração inicial de sacarose (substrato), vazão de ar e temperatura nas respostas rendimento, concentração final de xantana bruta e o índice de consistência *k* por planejamento experimental, de uma maneira geral, não foram significativos na região estudada. Nos ensaios do planejamento fatorial, para a linhagem ATCC 13951, obteve-se valores médios de $10,7\pm1,9$ g/L para a concentração final de xantana, $48,6\pm14,3\%$ para o rendimento, 1228 ± 310 mPa.sⁿ para o índice de consistência e $0,29\pm0,022$ para o índice de comportamento de fluxo. Para a linhagem ATCC 55298 obteve-se valores médios de $11,1\pm1,6$ g/L para a concentração final de xantana, $50,5\pm11,7\%$ para o rendimento, 1478 ± 223 mPa.sⁿ para o índice de consistência e $0,27\pm0,016$ para o índice de comportamento de fluxo.

A análise dos resultados por meio da função desejabilidade global aliada a uma análise crítica da variabilidade da qualidade da goma ao longo dos ciclos, realizados nas diferentes condições de operação do planejamento, forneceu dados importantes para se determinar os valores ótimos de temperatura e aeração para se obter simultaneamente alto rendimento e boa qualidade do produto. Os ensaios de validação, tanto com a linhagem ATCC 13951 quanto com a linhagem ATCC 55298, apontaram que a temperatura de 31°C e aeração de 1 vvm maximizam o rendimento (72,5% e 70%) e concentração final de xantana (12,5 g/Le 12,9 g/L) em processo de bateladas repetidas de 48h de duração cada batelada. O problema mais crítico encontrado no processo em escala de laboratório foi a intensa formação de espuma que levava ao arraste de fermentado.

Os ensaios em escala piloto evidenciaram que o escalonamento melhorou os fenômenos de transferência de oxigênio provavelmente pelo maior tempo de residência das bolhas de ar. Após 48 horas de fermentação, entretanto, a aeração precisou ser aumentada gradualmente de 1,5 vvm para 2,5 vmm para garantir a homogeneização e oxigenação do meio. O processo em bateladas repetidas foi realizado com a linhagem NRRL B-1459^{*} com suspeita de degradação e apresentou bons resultados somente até a quarta batelada quando houve uma mudança no padrão metabólico da linhagem.

7 Sugestões para próximos trabalhos

A produção de xantana em reator de coluna de bolha por meio do processo de batelada repetida deveria ser mais explorada com a linhagem ATCC 55298 que apresentou melhores resultados em escala de laboratório e menores problemas com formação excessiva de espuma. Uma abordagem interessante seria aplicar um aumento gradual de temperatura para favorecer a formação de biomassa nas primeiras 24 horas e a formação de produto após este tempo. Além disso, poder-se-ia explorar melhor a relação carbono/nitrogênio nestas duas diferentes fases do processo. A avaliação de um antiespumante adequado é de grande importância para este processo uma vez que a aeração vigorosa resulta em intensa formação de espuma.
8 Referências Bibliográficas

- Amanullah, A., Serrano, L-C. Galindo, E. and Nienow, A.W. Reproducibility of Pilot Scale Xanthan Fermentations. Biotechnological Progress, 12, 466-473, 1996
- Andrew, T.R. Applications of Xanthan Gum in Food and Related Products. In: ACS Symposium Series, 45, 231-241, 1977
- Barros Neo, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 401 p
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C., Lebert, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. Journal of Microbiological Methods, 25, 225-232, 1996
- Blanch, C., Legaz, M.-E., Vicente, C. Xanthan production by *Xanthomonas albilineans* infecting sugarcane stalks. Journal of Plant Physiology, 165(4), 366-374, 2008
- Blanch, H. and Clark, D.C. Primary Purification In:Biochemical Engineering, Marcel Dekker, New York, 491-496, 1996
- Braga, S.L.M. and Cunha, R.L. The effects of Xanthan conformation and sucrose concentration on the rheological properties of acidified sodium caseinate-xanthan gels. Food Hydrocolloids, 18, 977-986, 2004
- Breskin, I. and O'Conor, B. Eating well is the best revenge. Chemical Week, International Edition, May 31, 156 (21), 47–48, 1995
- Bueno, A.D. Recuperação Avançada de Petróleo em Reservatórios de Óleo Pesado. EDITAL CT-PETRO/CNPQ 17/**2004** acessado em 09/07/2008: <u>http://sigcti.mct.gov.br/pub/ctl/ctl.php?act=nav.prj_vis&idp=4548</u>

- Cadmus, M., Knutson, C.A., Lagoda, A.A., Pittsley, J.E. and Burton, K.A. Synthetic Media for Production of Quality Xanthan in 20 Liter Fermentors. Biotechnology and Bioengineering, 20, 1003-1014, 1978
- Cadmus, M.C., Jackson, L.K., Burton, K.A., Plattner, R.D.and Slodki, M.E. Biodegradation of Xanthan Gum by Bacillus sp. Applied Environmental Microbiology, 44(1), 5–11, 1982
- Cadmus, M.C., Lagoda, S.P., Burton, K.A., Pittsley, J.F., Knutson, C.A. and Jeanes, A.
 Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. Canadian Journal of Microbiology, 22, 942-948, 1976
- Capron, I., Brigand, G. and Muller, G. About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide. Polymer, v. 38, no 21, 5289-5297, 1997
- Casas, J.A., Santos, V.E. and García-Ochoa, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. Enzyme and Microbial Technology, 26, 282-291, 2000
- Chrles, M. and Radjai, M.K. Xanthan from acid Whey. In: ACS Symposium Series, 45, 27-39, 1977
- Cpron, L., Brigand, G. and Muller, G. Thermal denaturation and renaturation of a fermentation broth of xanthan: rheological consequences. International Journal of Biological Macromolecules, 23, 215-225, 1998
- Darke, A., Morris, E.R., Rees, D.A. and Welsh, E.J. Spectroscopic Characterization of Order-Disorder Transitions for Extracelullar Polysaccharides of Arthrobacter Species. . Carbohydrate Research, 66, 133-144, 1978

- De Vuyst, L., Van Loo, J. and Vandamme, E.J. Two-step Fermentation Process for Improved Xanthan Production by Xanthomonas campestrsi NRRL B-1459. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 39, 263–273, 1987
- Dea, I.C.M. and Morris, E.R. Synergistic Xanthan Gels. In: ACS Symposium Series, 45, 174-182, 1977
- Derringer, G; Suich, R. Simultaneos optimization of several response variables. Journal of Quality Technology, v.12, n. 4, p. 214-219, 1980
- Diaz, P.S., Vendruscolo, C.T., Vendruscolo, J.L.S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influencia de eletr[olitos na viscosidade de soluções aquosas de xantana. Semina Ciências Exatas e Tecnológicas, 25(1), 15-28, 2004
- Elliott, J. H. Some Rheological Properties of Gum Solutions. In: ACS Symposium Series, 45, 144-159, 1977
- Fernández, C. Alvarez, M.D., Canet, W. Steady shear and yield stress data of fresh and frozen/thawed mashed potatoes: Effect of biopolymers addition. Food ydrocolloids, 22(7), 1381-1395, 2008
- Flores Candia, J. L. and Deckwer, W. Xanthan Gum, In: The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation, volume 5, edited by Michael C. Flickinger and Stephen W. Drew, 2695-2711, 1999
- Fryer, L.C., Aramouni, F.M., and Chambers IV, E. Xanthan, Hydroxypropyl Methyl Cellulose and High Fructose Corn Syrup Sensory Effects in Reduced Calorie Syrup Model. Journal of Food Science, 61(1), 245-252, 1996
- Furtado, M. Aditivos de alimentos Desequilíbrio climático abre mercado para novos hidrocolóides. Revista Química e Derivados, 430, 2004

- Galindo, E. and Albiter, V. High-yield recovery of xanthan by precipitation with isopropyl alcohol in a stirred tank. Biotechnological Progress, 12, 540-547, 1996
- Galindo, E. and Salcedo, G. Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of Xanthomonas campestris. Enzyme and Microbial Technology, 19, 145-149, 1996
- Galindo, E., Salcedo, G. and Ramírez, M.E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. Journal Applied Microbiology and Biotechnology, 40(5), 1994
- García-Ochoa, F. and Casas, J.A. Apparent yield stress in xanthan gum solution at low concentration. Chemical Engineering Journal, 53, B41-B46, 1994
- García-Ochoa, F., Casas, J.A. and Mohedano, A.F. Precipitation of xanthan gum. Separation Science and Technology, 28, 1303-1313, 1993
- García-Ochoa, F., Santos, V.E., Alcón, A. Xanthan gum production: an unstructured kinetic model. Enzyme and Microbial Technology, 17, 206-217, 1995
- García-Ochoa, F., Santos, V.E., Casa, J.A., Gómes, E. Production and Isolation of Xanthan Gum. In: Carbohydrate Biotechnology Protocols, edited by Christopher Bucke, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999
- García-Ochoa, F., Santos, V.E., Casa, J.A., Gómes, E. Xanthan Gum: Production, Recovery and Properties. Biotechnology Advances, 18, 549-579, 2000
- García-Ochoa, F., Santos, V.E., Fritsch, A.P. Nutritional study of Xanthomonas campestris in xanthan gum production by factorial design of experiments. Enzyme and Microbial Technology, 14, 991-996, 1992

- Gerhardt, P. Manual of Methods for General Microbiology. American Society for Microbiolgy. Washington, 1981. 524 p.
- Gonzalez, R., Johns M.R., Greenfield, P.F., Pace G.W. Xanthan gum precipitation using ethanol. Process Biochemistry, 24, 200-203, 1989
- Guarda, A., Rosell, C. M. Benedito, C., Galotto, M. J. Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. Food Hydrocolloids, Volume 18, Issue 2, March 2004, Pages 241-247
- Herbst, H., Schumpe, A. and Deckwer, W-D. Xanthan Production in Stirred Tank Fermenters: Oxygen Transfer and Scale-up. Chemical Engineering Technology, 15, 425-434, 1992
- Holzwarth, G. Molecular Weight of Xanthan Polysaccharide. Carbohydrate Research, 66, 173-186, 1978
- Iseki, T., Takanashi, M., Hattori, H., Hatakeyama, T., Hatakeyama, H. Viscoelastic properties of xanthan gum hydrogels annealed in the sol state. Food Hydrocolloids, 15, 503:506, 2001
- Kamoun, S. and Kado, C.I. Phenotypic Switchig Affecting Chemotaxis, Xanthan Production, and Virulence in *Xanthomonas campestris*. Applied and Environmental Microbiology, 56(12), 3855-3860, 1990
- Kang, K.S. and Pettiti, D.J. Xanthan, Gellan, Welan and Rhamsan In: Industrial Gums: polussacharides and their derivatives. Edited by Whistler, R.L. and BeMiller, J.N., 3rd Edition, Academic Press, 1993, 642p.
- Katzbauer, B. Properties and applications of xanthan gum. Polymer Degradation and Stability, 59, 81-84, 1998

- Kennedy, J.F., Jones, P., Barker, S.A., Banks, G.T. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of Xanthomonas campestris cultures. Enzyme and Microbial Technology, 4, 39-43, 1982
- Kessler, W.R., Popovic, M.K., Robinson C.W. Xanthan Production in an External-Circulation-loop Airlift Fermenter. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 71, 101-106, 1993.
- Kidby, D., Sandford, P., Herman, A. and Cadmus, M. Maintenance procedure for the curtailment of genetic instability: Xanthomonas campestris NRRL B-1459. Applied and Environmental Microbiology, 33(4), 840-845, 1977
- Kidby, D.K. Culture Maintenance and Productivity. In: ACS Symposium Series, 45, 1-13, 1977
- Lapasin, R. & Pricl, S. Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications, Blackie Academic and Professional, Chapman&Hall, 1a ed. (1995)
- Lawson, C.J. and Symes, K.C. Xanthan Gum Acetolysis as a Toll for the Elucidation of Structure. In: ACS Symposium Series, 45, 183-191, 1977
- Ma, L. e Barbosa-Cánovas, G.V. Rheological characterization of Mayonnaise. Part II: Flow and viscoelastic properties at different oil and xanthan gum concentrations. Journal of Food Engineering, 25, 409-425, 1995
- Machado, J.C.V. Reologia e escoamento de fluidos: ênfase na industria do petróleo. Rio de Janeiro: Editora Interciência: Petrobras, 2002. 257 p
- Mantovani, E.S., Marini, D.C., Giglioti, E.A. Gramíneas hospedeiras de *Xanthomonas* sp., agente cauda cana-de-açúcar Summa Phytopathologica. 32 (2), 124-130, 2006

- Marcotte, M., Taherian, A.R., Trigui. M. and Ramaswamy, H.S. Evaluation of rheological properties of selected salt enriched food hydrocolloids. Journal of Food Engineering 48, 157–167, 2001
- Margaritis, A. and Zajic, J.E. Biotechnology review: mixing mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. Biotechnology and Bioengineering, 20, 939-1001, 1978
- Martínez-Salazar, J.M., Palacios, A.N., Sánchez, R., Caro A.D., Soberón-Chavez, G. Genetic stability and xanthan gum production in *Xanthomonas campestris* pv. campestris NRRL B1459. Molecular Microbiology, 8(6), 1053-1061, 1993
- Massey, R.C. and Buckling, A. Environmental regulation of mutation rates at specific sites Trends in Microbiology, 10(12), 580-584, 2002
- Maurdev, G. Saint-Jalmes, A., Langevin, D. Bubble motion measurements during foam drainage and coarsening. Journal of Colloid and Interface Science, 300, 735-743, 2006
- Milas, M. and Rinaudo, M. Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. Carbohydrate Research, 76, 189-196, 1979
- Milas, M., Rinaudo, M. and Tinland, B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. Polymer Bulletin, 14, 157-164, 1985
- Moorhouse, R., Walkinshaw, M.D. and Arnott, S. Xanthan Gum- Molecular Conformation and Interactions. In: ACS Symposium Series, 45, 90-102, 1977
- Moraine RA, Rogovin P. Kinetics of the Xanthan Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 15, 225-237, 1973

- Moraine, R.A. and Rogovin, P. Kinetics of polysaccharide B-1459 Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, vol VIII, 511-524,1966
- Moraine, R.A. and Rogovin, P. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. Biotechnology and Bioengineering, 13, 381-391, 1971
- Moreira, A.C.F. Síntese e avaliação de copolímeros derivados de acrilamida em processos de recuperação avançada de petróleo. Descrição de Projeto da CHAMADA PROSET CT-PETRO CNPQ 01/2002 acessado em 09/07/2008: <u>http://sigcti.mct.gov.br/pub/ctl/ctl.php?act=nav.prj_vis&idp=4416</u>
- Morris, E.R. Molecular Origin of Xanthan Solution Properties. In: ACS Symposium Series, 45, 81-89, 1977
- Nitschke, M. Rodrigues, V. Effect of virulence and serial transfers of Xanthomonas Campestris on Xanthan gum production. Brazilian Journal of Microbiology, 31, 58-60, 2000
- Nitschke, M., Rodrigues, V. E Schinatto, L.F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por X. Campestris C7L. Ciência e Tecnologia de Alimentos., vol.21, no.1, 82-85, 2001
- Pace, G.W. and Righelato, R.C. Production of extracellular microbial polysaccharides. Advances in Biochemical Engineering, 15, 41-70, 1981
- Pai, V.B., Khan, S.A. Gelation and rheology of xanthan/enzyme-modified guar blends. Carbohydrate Polymers, 49, 207-216, 2002
- Papagianni, M., Psomas, S.K., Batsilas, L., Paras, S.V., Kyriakidis, D.A., Liakopoulou-Kyriakides, M. Xanthan Production by Xanthomonas campestris in Batch Cultures. Process Biochemistry, 37, 73–80, 2001

- Pasika, W.M. Polysaccharide Polyeletrolytes. In: ACS Symposium Series, 45, 128-143, 1977
- Patton , J.T. and Dugar S.K. Growth kinetics of Xanthomonas campestris B-1459. Process Biochemistry, Aug/Sept, 46-49, 1981
- Peters, H.-U., Suh, I.-S., Schumpe, A. and Deckwer, W.-D. The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. Biotechnology Letters, 15(6), 565-566, June 1993
- Peters, H-U., Herbst, H., Hesselink, P.G.M., LuÈndsdorf, H., Schumpe, A. and Deckwer ,W-D. The influence of agitation rate on xanthan production by Xanthomonas campestris. Biotechnology and Bioengineering, 34, 1393-1397, 1989
- Pinches, A. and Pallent, L.J. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. Biotechnology and Bioengineering,28, 1484-1496, 1986
- Pons, A., Dussap, C.G. and Gros, J.B. Xanthan batch fermentations: compared performances of bubble column and a stirred tank fermentor. Bioprocess Engineering, 5, 107-114, 1990
- Pons, A., Dussap, C.G., Gros J.B. Modeling Xanthomonas Campestris Batch Fermentation in a Bubble Column. Biotechnology and Bioengineering, 33, 394-405, 1989
- Prins, A. van't Riet, K. Proteins and surface effects in fermentation: foam, antifoam and mass transfer. Trends in Biotechnology, 5(11), 296-301, 1987
- Psomas, S.K., Liakopoulou-Kyriakides, S.K., Kyriakidis, D.A. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, 35, 273-280, 2007

- Rogovin, P., Albrecht and Sohns, V. Production of industrial-grade polysaccharide B-1459. Biotechnology and Bioengineering, vol VII, 161-169,1965
- Sandford, P.A., Pittsley, J.E., Knudson, C.A., Watson, P.R., Cadmus, M.C. and Jeanes, A. Variation in Xanthomonas campestris NRRL B-1459: Characterization of Xanthan Products of Differing Pyruvic Acid Content. In: ACS Symposium Series, 45, 192-210, 1977
- Sandvik, E.I. and Maerker, J.M. Application of Xanthan Gum for Enhanced Oil Recovery. In: ACS Symposium Series, 45, 242-264, 1977
- Schröter, K. Flaschel, E., Pühler, A., Becker, A. Xanthomonas campestris pv. campestris secretes the endoglucanases ENGXCA and ENGXCB : construction of an endoglucanase-deficient mutant for industrial xanthan productionApplied microbiology and biotechnology, 55(6), 727-733, 2001
- Schweickart, R.W. and Quinlan, A.V. Kinetics of Xanthan Production When NH3-N Limits Biomass Synthesis and Glucose Limits Polysaccharide Synthesis. Journal of Biomechanical Engineering, 111, 166-172, May 1989
- Shimada, K., Okada, H., Matsuo, K. and Yoshioka, S. Involvement of Chelating Action and Viscosity in the Antioxidative Effect of Xanthan in Oil/Water Emulsion. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 60, 125–127, 1996
- Shu, Ch-H., Yang, Sh-T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of Xanthomonas campestris. Biotechnology and Bioengineering,35, 454-468, 1990
- Shu, Ch-H., Yang, Sh-T. Kinetics and modeling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 37, 567-574, 1991

- Slodki, M.E. and Cadmus, M.C. Production of microbial polysaccharides. Advances in Applied Microbiology, 23, 19-49, 1978
- Smith, J.H. and Pace, G.W. Recovery of microbial polysaccharides. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 32, 119-129, 1982
- Sousa, C.S., Souza, C.S., Harber, L.L., Santana, D.G., Arruda, A.S., Takatsu, A. Method of innoculation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the root system for quick evaluation of cabage resistance to black root. Boscience Journal, 19(1), 53-56, 2003
- Souw P, Demain AL. Nutritional studies on xanthan production by Xanthomonas campestris NRRL B-1459. Applied and Environmental Microbiology, 37, 6, 1186-1192, June 1979
- Steffe, J.F. Rheological Methods in Food Process Engineering, second edition (second printing).Freeman Press, East Lansing, MI, USA, 1996
- Stevenson, P., Li, X., Evans, G.M. A mechanism for internal reflux in foam fractionation. Biochemical Engineering Journal, 39, 590-593, 2008
- Suh, I.-S., Herbst, H., Schumpe, A. and Deckwer, W.-D. The molecular weight of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. Biotechnology Letters, 12(3), 201-206, 1990
- Suh, II-S., Schumpe, A., Deckwer, W-D. Xanthan Production in Bubble Column and Air Lift Reactors. Biotechnology and Bioengineering, 39, 85-94, 1992
- Tait, M.I., Sutherland, I.W., Clarke-Sturman, A.J. Effect of growth conditions on the production composition and viscosity of Xanthomonas campestris exopolysaccharide. Journal of General Microbiology, 132, 1483-1492, 1986

- Tako, M. Molecular Origin for Rheological Characteristics of Xanthan Gum.Viscoelasticity o Biomaterial. . In: ACS Symposium Series, 489, 268-281, 1992
- Vorhölter, F-J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Rückert, C., Schmid, J., Sidhu, V. K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S.A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K., Pühler, A. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. Journal of Biotechnology, 134, 33–45, 2008
- Weiss, R.M. and Ollis, D.F. Extracellular microbial polysaccharides: I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 22, 859-873, 1980
- Wells, J. Extracellular Microbial Polysaccharides A Critical Overview. In: ACS Symposium Series, 45, 299-313, 1977
- Whitcomb, P.J., Ek, B.K. and Macosko, C.W. Rheology of Xanthan Gum Solutions. In: ACS Symposium Series, 45, 160-173, 1977
- Xuewu, Z., Xin, L., Dexiang, G., Wei, Z., Tong, X. and Yonghong, M. Rheological Models for Xanthan Gum. Journal of Food Engineering, 21, 203-209, 1996
- Yang-Ming Lo, Shang-Tian Yang and David B. Min Ultrafiltration of Xanthan Gum Fermentation Broth: Process and Economic Analyses. Journal of Food Engineering, 31, 219-236, 1997