

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

**APROVEITAMENTO DE SORO DE QUEIJO PARA PRODUÇÃO DE
GOMA XANTANA**

REJANE CARLA GOLLO FORNARI

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

ERECHIM, RS - BRASIL

MARÇO DE 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

APROVEITAMENTO DE SORO DE QUEIJO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

REJANE CARLA GOLLO FORNARI

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

Comissão Julgadora:

Profa. Francine Ferreira Padilha, D.Sc.
Orientadora

Profa. Helen Treichel, D.Sc.
Orientadora

Profa. Adilma Pippa Scamparini, D.Sc.

Prof. Alexandre J. Cichoski, D.Sc.

Erechim, 31 de março de 2006.

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

Dedico este trabalho:

Ao meu filho Arthur, razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus pais, Nelson e Iracy, que me deram a vida, e com muito amor, carinho, e amizade me ensinaram os caminhos que deveria seguir. Obrigada por tudo, principalmente por terem me recebido novamente em casa, depois de alguns anos trabalhando fora e mesmo depois de casada e com um bebezinho. Muito, mas muito obrigada pela ajuda de terem cuidado do meu filho durante esses dez meses, tenho certeza que ninguém poderia cuidar melhor dele do que vocês. Sentiremos muita falta, porque amamos vocês.

Ao meu marido, Marcos Aurélio, pelo amor e pela enorme paciência de ter ficado longe, primeiro os dois anos que fiquei em Porto Alegre e depois mesmo sabendo que seriam mais dois anos longe, me apoiou e incentivou a fazer mestrado. Sei que tivemos alguns momentos difíceis porque não era fácil para você entender o que eu tinha que fazer tanto na URI, mas compreendo que era difícil para você ficar afastado do Arthur nos primeiros meses de vida dele. Obrigado pelo apoio, amor e pelo filho lindo que nós tivemos.

Ao presente maravilhoso que Deus me deu, meu filho Arthur, que fez mestrado junto comigo durante nove meses. Nos momentos mais difíceis, foi você com seu jeitinho lindo que me fez sorrir, erguer a cabeça e chegar até o fim. Muito obrigado por você ter chegado na minha vida e ter me feito tão feliz.

A toda minha família que sempre me apoiou, principalmente as minhas irmãs Silvana e Rosane pela amizade, ajuda e incentivo.

A todas as pessoas que me ajudaram uma em especial eu tenho muito que agradecer, pois ela foi meu braço direito, a pessoa que mais me ajudou na parte experimental, sempre prestativa, atenciosa e mesmo nas horas difíceis estava sempre de bom humor. Marceli muitoooooooooooooooooooo obrigada.

As minhas orientadoras, Francine Padilha e Helen Treichel pelo apoio, amizade e até mesmo pelos puchões de orelha nas horas que eu merecia.

Aos professores Alexandre Cichoski e Débora de Oliveira pelas valiosas contribuições feitas durante os seminários.

As novas amigadas que eu fiz durante o mestrado: Lisandra, Gêci, Micheli, Marcell, Roberta Kruger, Clarissa, Cassiano, Aline.

À minha velha amiga Beta, que esteve sempre junto, graduação, pós-graduação, mestrado e até mesmo no momento de ser mãe, pois tivemos bebê na mesma época. Espero que a distância não separe a nossa amizade e que o Arthur e a Antônia ainda possam brincar juntos.

A uma amiga em especial, Thaís, nos conhecemos no mestrado, mas nossa amizade parece de anos. Obrigada pelas horas em que ficamos conversando.

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

A todos professores do curso, que de uma forma ou de outra ajudaram no meu crescimento profissional.

A todo pessoal que sempre estava no laboratório de biotecnologia e da vegetal, pela ajuda e amizade.

Ao pessoal da central do prédio 9 pela ajuda. Um obrigado muito especial ao Rogério, pela enorme ajuda no cromatógrafo, pois sem ele a coisa ia ser muito mais difícil. Ao pessoal da central do prédio 11 por me agüentar quase direto na centrífuga.

A ASCAR/EMATER por ter concedido a licença de dois anos para a realização do mestrado, e agora pela transferência tão desejada.

A CAPES pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

À todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.
Rejane C. Gollo Fornari

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

APROVEITAMENTO DE SORO DE QUEIJO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

Rejane Carla Gollo Fornari

Março/2006

Orientadores: Prof^ª. Francine Ferreira Padilha, D.Sc.

Prof^ª. Helen Treichel, D.Sc.

Goma xantana é um polissacarídeo extracelular sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas* e de extrema importância no aspecto comercial como polissacarídeo microbiano. A principal característica exibida pela goma é a sua habilidade para modificar em particular a reologia ou comportamento fluído de soluções. A sua aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica é devida principalmente as suas propriedades de formar soluções viscosas. Esse polímero tem sido o mais utilizado em alimentos, no Brasil e no mundo, sendo sua aplicação aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration). O soro de queijo possui proteínas de alto valor biológico e, na maioria das indústrias de processamento de leite, é tratado como resíduo e descartado inadequadamente. Este descarte, além de trazer danos à natureza, corresponde também a um desperdício inaceitável diante de suas características nutricionais. O objetivo deste trabalho foi produzir goma xantana utilizando soro de queijo como substrato, sendo que foram testados soro de queijo tipo prato e mussarela. Utilizou-se no estudo as linhagens de *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 e *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* 1182 que foram cedidas pelo Instituto Biológico - Campinas, SP. O meio otimizado para produção foi soro de queijo, adicionado dos sais $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e K_2HPO_4 . A produtividade máxima obtida

foi de 26,35 g.L⁻¹, em soro de queijo mussarela na linhagem 1182, resultado este superior aqueles encontrados em literatura quando utiliza-se substratos industriais para produção de goma xantana. Análise de viscosidade aparente foram realizadas em soluções aquosas e salinas de goma a 3% a 25°C com taxa de cisalhamento de 13,2s⁻¹ onde foi encontrado valor máximo de e 61,35 m.Pa.s sendo que com a adição de sais ocorreram aumentos na viscosidade aparente. Verificou-se que não ocorreram diferenças significativas usando-se soro de queijo mussarela ou prato assim como entre as duas linhagens de *Xanthomonas* estudadas nos valores de produtividade e viscosidade aparente. A composição de monossacarídeos foi estudada através de HPLC onde foram encontradas glicose e manose em todas as gomas sintetizadas, nas com *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* foi observada ainda a presença de ramnose. Concluiu-se que foi possível a produção de goma xantana em ambas as linhagens e nos dois tipos de soro de queijo estudados, e que não ocorreram diferenças significativas de produção e de viscosidade aparente para as duas linhagens bem como para os dois tipos de soro estudados.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

Recovering the Cheese whey to Xanthan gum production

Rejane Carla Gollo Fornari

Março/2006

Advisors: Prof^a. Francine Ferreira Padilha, D.Sc.

Prof^a. Helen Treichel, D.Sc.

Xanthan gum is an extracellular polysaccharide synthesized by *Xanthomonas* bacteria and of extreme commercial importance as a microbial polysaccharide. The main characteristic of this gum is its ability to modify the rheology or flow behavior of solutions. Its application in the food industry, pharmaceutical and petrochemical is mainly as a means to increase viscosity of solutions. This polymer has been the most used in foods, in Brazil and around the world and its application is approved by the FDA (Food and Drug Administration). Cheese whey has proteins of high biological value and, in most of dairy industries, it is treated as residue and inadequately discarded. Besides damaging the environment, its disposal is an unacceptable wastefulness due to its nutritional characteristics. The aim of this work was to produce xanthan gum using cheese whey as substrate, testing “prato” and mussarela cheese whey. *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 and *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* 1182 strains were used and were supplied by the Biological Institute - Campinas, SP. The optimized medium for production was cheese whey, MgSO₄·7H₂O 0.1% and K₂HPO₄ 2%. The maximum productivity was 26.35 g.L⁻¹, The results found in this work were superior of those found in literature when using cheese whey for production of xanthan gum. Analysis of apparent viscosity was made in aqueous and saline solutions of gum at 3%, 25°C with shear rate of 13,2s⁻¹, where the maximum viscosity found was of 61,35 m.Pa.s. The addition of different types of salt increased apparent viscosity. Significant differences in productivity and apparent viscosity have not occurred between media with mussarela or “prato” whey as well as between the two *Xanthomonas* strains studied. The

composition of monosaccharide was studied through HPLC. Glucose and mannose were found in all synthesized gums. In gums synthesized by *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 the presence of rhamnose was still observed.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS	4
2.2	XANTHOMONAS SP	6
2.3	GOMA XANTANA	7
2.3.1	<i>Produção de goma xantana</i>	9
2.4	SORO DE QUEIJO	13
2.5	RECUPERAÇÃO DO BIOPOLÍMERO	15
2.6	TOXICIDADE E APLICAÇÕES DA GOMA XANTANA	16
2.7	REOLOGIA	18
2.8	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	MICROORGANISMOS	23
3.2	SORO DE QUEIJO	23
3.3	METODOLOGIA	23
3.3.1	<i>Manutenção dos microrganismos e Caracterização</i>	23
3.3.2	<i>Determinações físico-químicas no soro de queijo</i>	23
3.3.2.1	pH	24
3.3.2.2	Acidez Dornic	24
3.3.2.3	Gordura	24
3.3.2.4	Proteína	24

3.3.2.5 Lactose.....	24
3.3.2.6 Minerais – (cinzas)	24
3.3.2.7 Nitrato.....	24
3.3.3 <i>Produção de células</i>	25
3.3.4 <i>Produção de goma xantana</i>	25
3.3.5 <i>Planejamentos experimentais</i>	25
3.3.6 <i>Recuperação da goma xantana</i>	27
3.3.7 <i>Análise do consumo de lactose</i>	28
3.3.8 <i>Análise de viscosidade aparente</i>	28
3.3.9 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	29
3.3.9.1 Hidrólise do polissacarídeo	29
3.3.9.2 Análise cromatográfica (CLAE).....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA COLÔNIA	30
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO	32
4.3 EXPERIMENTOS PRELIMINARES	33
4.4 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA	34
4.5 CONSUMO DE LACTOSE	50
4.6 PH DO MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	51
4.7 REOLOGIA	53
4.7.1 <i>Viscosidade aparente do caldo de fermentação</i>	53
4.7.2 <i>Viscosidade aparente das soluções aquosas de goma</i>	55
4.7.3 <i>Viscosidade aparente das soluções salinas de goma</i>	64
4.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	65
5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	71
5.1 CONCLUSÕES	71
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da goma xantana (GARCÍA-OCHOA <i>et al.</i> , 2000).....	8
Figura 2 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, 28°C ± 2°C, 48 horas, de <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230.....	30
Figura 3 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, 28°C ± 2°C, 48 horas, de <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182.....	31
Figura 4 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana.	36
Figura 5 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana.....	37
Figura 6 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana	38
Figura 7 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana	39
Figura 8 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana.	42
Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana.....	43
Figura 10 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana.....	44
Figura 11– Superfície de resposta com as produtividades de goma em relação as variáveis fosfato de potássio e sulfato de magnésio.....	45
Figura 12 - Aspecto da goma xantana precipitada, sintetizada a partir de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182 com soro de queijo mussarela.....	48
Figura 13 - Aspecto da goma xantana precipitada, sintetizada a partir de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182 com soro de queijo prato	49
Figura 14 - Aspecto da goma xantana precipitada, sintetizada a partir de <i>X. campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230 com soro de queijo mussarela.....	49

Figura 15 - Aspecto da goma xantana precipitada, sintetizada a partir de <i>X. campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230 com soro de queijo prato	50
Figura 16- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de soro de queijo Mussarela e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> , 72h de fermentação, leituras a 25°C, ida(a) e volta(b). Ida ($R^2 = 0,9992$, $K = 1,926$, $n = 0,475$) e volta ($R^2 = 0,9988$, $K = 1,126$, $n = 0,572$).....	59
Figura 17 - Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de soro de queijo Prato e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> , 72h de fermentação, leituras a 25°C, ida(a) e volta(b). Ida ($R^2 = 0,9970$, $K = 2,149$, $n = 0,467$) e volta ($R^2 = 0,9994$, $K = 1,218$, $n = 0,571$).....	60
Figura 18 - Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de soro de queijo Mussarela e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> , 72h de fermentação, leituras a 25°C, ida(a) e volta(b). Ida ($R^2 = 0,9985$, $K = 1,898$, $n = 0,571$) e volta ($R^2 = 0,9980$, $K = 1,314$, $n = 0,640$).....	61
Figura 19 - Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de soro de queijo Prato e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> , 72h de fermentação, leituras a 25°C, ida(a) e volta(b) Ida ($R^2 = 0,9988$, $K = 0,550$, $n = 0,645$) e volta ($R^2 = 0,9981$, $K = 0,560$, $n = 0,643$).....	62
Figura 20 Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH ₂ , para separação de açúcares da goma comercial, com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) manose; (c) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.	65
Figura 21- Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH ₂ , para separação de açúcares da goma sintetizada com <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182 em soro de queijo mussarela (2) e <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182 em soro de queijo prato (1), com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) ? (c) manose; (d) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.....	66
Figura 22- Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH ₂ , para separação de açúcares da goma sintetizada com <i>X. campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230 em soro de queijo mussarela (2) e <i>X. campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230 em soro de queijo prato (1), com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) ? (c) ramnose (d) manose; (e) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.....	66
Figura 23- Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH ₂ , para separação de açúcares da goma sintetizada com <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182 em soro de queijo mussarela (2)	

e *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 em soro de queijo mussarela (1), com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) ? (c) manose; (d) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.....67

Figura 24- Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH₂, para separação de açúcares da goma sintetizada com *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 em soro de queijo prato (2) e *X. campestris* pv *manihotis* 1182 em soro de queijo prato (1), com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) ? (c) manose; (d) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição centesimal média do soro de queijo.....	14
Tabela 2 – Ensaios preliminares realizados para verificar a produção de goma xantana nos dois tipos de soro de queijo e nas duas linhagens de <i>X. campestris</i> em estudo.....	26
Tabela 3 - Variáveis e níveis estudados nos planejamentos experimentais 2 ³	26
Tabela 4- Variáveis e níveis estudados nos planejamentos experimentais 2 ² com meio de soro de queijo.....	27
Tabela 5 – Caracterização do soro de queijo mussarela e do soro de queijo prato.....	32
Tabela 6 – Experimentos realizados para verificar a produção de goma xantana em diferentes soro de queijo utilizados como meio e com <i>X. campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230 e <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182.....	34
Tabela 7 – Matriz do planejamento experimental 1 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana com <i>Xathomonas campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230 e soro de queijo mussarela.....	36
Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental 2 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana com <i>Xathomonas campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182 em soro de queijo mussarela.....	37
Tabela 9 – Matriz do planejamento experimental 3 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana com <i>Xathomonas campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230 e soro de queijo prato.....	38
Tabela 10 – Matriz do planejamento experimental 4 (valores codificados e reais) com respostas de produção e produtividade de goma xantana com <i>Xathomonas campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182 e soro de queijo prato.....	39
Tabela 11– Matriz do planejamento experimental 5 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana com <i>Xathomonas campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182 e soro de queijo prato.....	41
Tabela 12 – Matriz do planejamento experimental 6 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana. <i>Xathomonas campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182 com soro de queijo mussarela.....	42

Tabela 13 – Matriz do planejamento experimental 7 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana. <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>mangiferae</i> índice 1230 com soro de queijo prato.....	43
Tabela 14 – Matriz do planejamento experimental 8 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana. <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1230 com soro de queijo mussarela.....	44
Tabela 15 – Resultado de produtividade e produção média dos ensaios realizados com 80ml de soro de queijo; 2% de fosfato de potássio e 0,1% de sulfato de magnésio.....	46
Tabela 16 – Valores do consumo de lactose obtidos no meio de fermentação para os dois tipos de soro de queijo e as duas linhagens estudadas, medidas a cada 12 horas, num total de 72 horas.....	51
Tabela 17 – Valores de pH obtidos no meio de fermentação para os dois tipos de soro de queijo e as duas linhagens estudadas, medidas a cada 12 horas, num total de 96 horas....	52
Tabela 18 – Viscosidade aparente a 25°C, 191,4s ⁻¹ , para o caldo de fermentação antes e após a retirada das células, meio contendo soro de queijo mussarela com <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182, durante 72 horas de fermentação.	53
Tabela 19 – Viscosidade aparente a 25°C, 191,4s ⁻¹ , para meio de fermentação antes e após a retirada das células, meio contendo soro de queijo mussarela com <i>X. campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230, durante 72 horas de fermentação.....	54
Tabela 20 – Viscosidade aparente a 25°C, 191,4s ⁻¹ , para meio de fermentação antes e após a retirada das células, meio contendo soro de queijo prato com <i>X. campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230, durante 72 horas de fermentação.....	54
Tabela 21 – Viscosidade aparente a 25°C, 191,4s ⁻¹ , para meio de fermentação antes e após a retirada das células, meio contendo soro de queijo prato com <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> 1182, durante 96 horas de fermentação.....	55
Tabela 22 – Viscosidade aparente a 25°C, 13,2s ⁻¹ , para soluções aquosas a 3% de gomas sintetizadas com duas linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> e dois tipos de soro de queijo, com 72h de fermentação.....	56
Tabela 23 – Viscosidade aparente a 25°C, 13,2s ⁻¹ , para soluções de gomas a 3% adicionadas de 0,1% de sais, sintetizadas com duas linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> e dois tipos de soro de queijo, com 72h de fermentação.....	64

Tabela 24 – Equação da reta e R ² obtidos para as diferentes curvas de calibração dos padrões de açúcar.....	69
Tabela 25 - Tempo de retenção (Tr) em minutos e concentração dos açúcares (g/ml) da goma comercial e das gomas sintetizadas com <i>X. campestris</i> pv <i>mangiferaeindicae</i> 1230 e pv <i>manihotis</i> 1182 com soro de queijo prato e mussarela.	70

1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros microbianos são macromoléculas formadas por monossacarídeos e derivados ácidos, podendo ser sintetizados por bactérias, fungos e leveduras. Os biopolímeros encontram vasto campo de aplicação nos mais variados ramos industriais, sendo que suas características reológicas são dependentes da composição química (SUTHERLAND, 1982).

A goma xantana é um biopolímero produzido por bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas* (PAPAGIANNI *et al.*, 2001). Possui estrutura primária formada por unidades repetidas de pentassacarídeos formados por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A goma xantana foi o segundo polissacarídeo microbiano a ser comercializado e o primeiro utilizado na indústria de alimentos como espessante, emulsificante, estabilizante e agente de suspensão, aprovado pelo FDA (Food and Drugs Administration) em 1969. No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimento. Atualmente é o único polissacarídeo microbiano que vem sendo comercializado em grande escala (MORRIS, 1984).

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

Devido ao mercado crescente de polissacarídeos de alto valor agregado, estudos estão sendo feitos objetivando o aproveitamento de rejeitos industriais na bioprodução de goma xantana. A utilização de substratos alternativos, como soro de queijo, poderia auxiliar a produção de goma xantana no país, ajudando a eliminar os problemas ambientais como descarte de efluentes, além do que o Brasil poderia suprir sua própria demanda de goma xantana com maior competitividade no preço final.

No Brasil o substrato representa um baixo custo de produção, entretanto em outros países o custo do meio de fermentação representa um fator crítico sob o aspecto comercial na produção do polissacarídeo. Por esse motivo, vem aumentando muito o interesse por substratos alternativos como por exemplo resíduos industriais que além de serem descartados tornando-se sérios problemas ambientais podem ser utilizados como uma alternativa para produção de polissacarídeos diminuindo custos de produção

Soro de queijo vem sendo estudado na produção de polissacarídeos como goma xantana (ANTUNES *et al.*, 2000^(a) ; NITSCHKE *et al.*, 2001), e goma gelana (FIALHO, *et al.*, 1999).

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

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

A produção mundial de leite bovino em 2005 foi de 530.718mil toneladas, sendo que em 2004 o Brasil produziu cerca de 23.320 mil ton de leite, deste total foram produzidos 444.501ton de queijo gerando em torno de 4 milhões de ton de soro. Somente o Rio Grande do Sul produziu 2.306 milhões de litros de leite o que poderia produzir 20mil toneladas de queijo, ou seja, cerca de 200mil ton de soro de queijo (CNPGL/EMBRAPA, 2006)

O descarte do soro, além de trazer danos à natureza, corresponde também a um desperdício inaceitável devido a apreciável quantidade de proteínas, lactose, e demais compostos, tornando-se assim muito atrativo além de economicamente viável para processos fermentativos, onde poderá ser utilizado principalmente como fonte de carbono de baixo custo.

Considerando o exposto, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de goma xantana utilizando as linhagens *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 e *X.*

campestris pv *manihotis* 1182 e como substratos soro de queijo Prato e Mussarela. Para isso otimizou-se as condições de produção de goma xantana em meio de soro e após analisou-se as propriedades reológicas de viscosidade aparente das soluções aquosas a 3% e das soluções salinas do biopolímero a 3% com soluções de NaCl 0,1%; CaCl₂ 0,1% e KCl 0,1%, e a composição química da goma produzida através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polissacarídeos Microbianos

Polissacarídeos são classificados de três formas em relação à origem, provenientes de plantas terrestres, subdividindo-se em estruturais (amido, celulose, pectina, etc), exudados (goma arábica) e oriundos de sementes (goma guar e locusta); provenientes de plantas aquáticas (agar, carragena); e de microrganismos (dextrana, gelana, xantana, etc), sendo que este último recebe a denominação de biopolímeros microbianos (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

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

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

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

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

As propriedades reológicas são determinadas por sua composição química, grupamentos e ligações moleculares, seu peso molecular médio e sua distribuição. Os EPS microbianos podem ser polímeros de monossacarídeos aniônicos, neutros e catiônicos ou derivados destes e, freqüentemente, contêm grupos laterais como acetato, piruvato, succinato, componentes lipídicos, nitrogênio orgânico ou íons inorgânicos. O grau de substituição destes grupos laterais tem um importante efeito sobre as propriedades dos polímeros (PACE, 1991).

Segundo sua localização morfológica os biopolímeros podem ser divididos em três grandes grupos: intracelular, integrantes da parede celular e extracelulares (exopolissacarídeos ou EPS) (BLACK, 1993). Os extracelulares como a goma xantana, são excretados na forma de muco para o meio, sendo estes que despertam maior interesse devido ao fato de ficarem diretamente no meio onde são secretados (WILKINSON, 1958).

Os polissacarídeos têm papéis específicos como compostos de armazenamento (glicogênio), compostos estruturais (quitina), mediadores das interações do microrganismo com o meio ambiente (polissacarídeos extracelulares) (PACE, 1991).

Os EPS desempenham diferentes papéis, que incluem: proteger o microrganismo contra desidratação; servir de barreira, impedindo que vírus e anticorpos se liguem a sítios específicos sobre a parede celular; acoplar e neutralizar toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; atuar como fonte de carbono e energia; converter o excesso de substrato em uma massa espumosa que é mais difícil de ser metabolizada por outros microrganismos; interagir com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas (PACE, 1991).

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

2.2 *Xanthomonas sp*

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

As bactérias *Xanthomonas* pertencem à família Pseudomonaceae. Todos os organismos deste gênero são patógenos de plantas. Os patovares de *Xanthomonas* infectam mais de 240 gêneros de plantas mono e dicotiledôneas, incluindo alguns de interesse na agricultura, como, repolho, alfafa, feijão. (GARCIA-ÓCHOA, 2000) Microrganismos deste gênero são bactérias fitopatogênicas relativamente comuns responsáveis por causar “black root” em crucíferas, resultando em grandes perdas econômicas (ESGALHADO, *et al.*, 1994)

As *Xanthomonas* são bastonetes (0,4-0,7 μ m de largura e 0,7-1,8 μ m de comprimento), gram-negativas, móveis por flagelo único (1,7-3 μ m de comprimento), com exceção a *X. maltophilia* que possui vários flagelos. São quimiorganotrófico, capazes de usar uma variedade de carboidratos, sais e ácidos orgânicos como fonte de carbono, são estritamente aeróbicos, com um tipo de metabolismo respiratório que requer oxigênio como o aceptor de elétrons terminal. Fatores de crescimento geralmente requeridos incluem metionina, ácido glutâmico, ácido nítrico ou a combinação desses. A temperatura ótima de crescimento fica entre 25 a 30°C, e possuem máxima tolerância ao NaCl de 2,0-5,0%. Capaz de fazer proteólise no leite para obter fontes de nitrogênio (HOLT, *et al.*, 1994).

As colônias de *Xanthomonas sp* são normalmente amarelas, lisas e viscosas. A estrutura do envoltório da célula é semelhante à de outras células Gram-negativas. Pigmentos amarelos, xantomonadinas, estão presentes em todas as espécies de *Xanthomonas*, mas podem estar ausentes quando acontece alguma degradação (GARCÍA-OCHOA, 2000). São essencialmente fitopatogênicas, com exceção da *X. maltophilia* que é um patógeno humano (HOLT, *et al.*, 1994)

Vários patovares de *Xanthomonas campestris*, particularmente, e outras espécies de *Xanthomonas*, produzem EPS. Por serem bactérias essencialmente fitopatogênicas, a produção de EPS está relacionada com sua sobrevivência, enquanto na superfície do vegetal hospedeiro, pois este é um ambiente inóspito à bactéria. Com a invasão e a patogenicidade, causam uma variedade de doenças e sintomas, incluindo necrose, gomose e/ou doenças vasculares ou parenquimatosas em folhas, ramos ou frutos de muitas plantas (HAYWARD, 1993).

2.3 Goma Xantana

Goma Xantana é um polissacarídeo sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas*, é um importante biopolímero industrial. A descoberta da goma xantana foi resultado de um programa sistemático de busca ou *screening* iniciado pelo Departamento de Agricultura dos EUA. Em consequência do sucesso comercial da dextrana na década de 1940, o departamento iniciou uma busca exaustiva por microrganismos capazes de produzir polissacarídeos solúveis em água. O resultado deste programa foi à descoberta da xantana na década de 1950 nos Laboratórios de Pesquisa Regionais do Norte (NRRL) no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (MORRIS, 1984)

Este laboratório descobriu que bactérias do gênero *Xanthomonas campestris* encontradas em repolho produziam um polissacarídeo com propriedades excepcionais, que poderia ser usado como agente estabilizador para emulsões e suspensões, controlando a reologia das soluções aquosas (MORRIS, 1984).

A produção comercial de goma xantana começou em 1964, sendo o segundo polissacarídeo microbiano a ser comercializado e o primeiro utilizado na indústria de alimentos como espessante, emulsificante, estabilizante e agente de suspensão, aprovado pelo FDA (Food and Drugs Administration) em 1969. No Brasil, a adição de goma xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimento. Atualmente é o único polissacarídeo microbiano que vem sendo comercializado em grande escala (MORRIS, 1984).

O sucesso da goma xantana induziu a difusão de programas de triagem de microrganismos que possam produzir biopolímeros em igual ou maior interesse comercial. Os parâmetros levados em consideração na seleção da cepa NNRL B 1459 de *X. campestris* pv *campestris* orientam as triagens, visto que, em geral, toma-se a qualidade e produção de xantana por esta cepa como uma espécie de padrão ao qual outros microrganismos, ou mesmo diferentes processos de produção, são comparados (MOREIRA, 2002).

A goma xantana, possui uma estrutura primária que consiste em unidades repetidas de pentassacarídeos formados por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico na proporção molar de 2,8:2,0:2,0 e grupos piruvato e acetil. Sua cadeia principal consiste em unidades de β -D-glucose com ligações nas posições 1 e 4. O trissacarídeo da cadeia lateral contém uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de resíduos de glucose da cadeia principal. Aproximadamente metade dos resíduos D-manose terminais contém um ácido pirúvico ligado, com distribuição indeterminada. A unidade D-manose ligada à cadeia

principal contém um grupo acetil na posição O-6. A presença dos ácidos acético e pirúvico produz um polissacarídeo do tipo aniônico (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A distribuição do peso molecular varia de 2×10^6 a 20×10^6 . Esta distribuição do peso molecular depende da associação entre cadeias, dando forma a agregados de diversas cadeias individuais. As variações nas condições de fermentações e produção são fatores que influenciam no peso molecular da xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

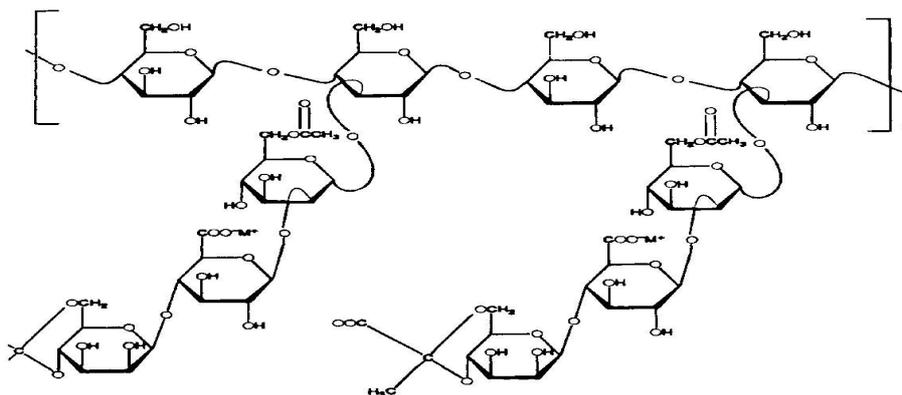


Figura 1 – Estrutura da goma xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000)

As soluções de xantana mostram um comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da deformação do fluido. A viscosidade das soluções praticamente não se alteram com a temperatura entre 4° e 93°C , com pH entre 1 e 13 e com forças iônicas equivalentes a concentrações de cloreto de sódio entre 0,05% e 1%. Há compatibilidade plena com uma grande diversidade de insumos usados industrialmente, como metais, ácidos, sais, agentes redutores, outros texturizantes, solventes, enzimas, surfactantes e conservantes. Uma propriedade interessante da goma xantana é que em conjunto com galactomananas (goma guar e goma de algaroba) apresenta um aumento sinérgico de viscosidade e formam géis termorreversíveis (KALOGIANNIS *et al.*, 2003).

A goma xantana com alto grau de acetilação e especialmente baixo grau de piruvatação, aumenta a viscosidade de suas soluções porque associações intermoleculares são favorecidas. Um problema importante relacionado com a produção de goma xantana deve-se à instabilidade das linhagens de *Xanthomonas campestris*, resultando em uma variação de peso molecular do polissacarídeo, e do grau de piruvatação e acetilação. Com a identificação dos genes responsáveis pela síntese do polissacarídeo é possível, através de

manipulações genéticas, alterar o grau de acetilação, aumentar o grau de piruvatação e aumentar o rendimento da goma (MAUGERI, 2001).

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

No Brasil o substrato representa um baixo custo de produção, entretanto em outros países o custo do meio de fermentação representa um fator crítico sob o aspecto comercial na produção do polissacarídeo. Por esse motivo, vem aumentando muito o interesse por substratos alternativos como, por exemplo, resíduos industriais que além de serem descartados tornando-se sérios problemas ambientais podem ser utilizados como uma alternativa para produção de polissacarídeos diminuindo custos de produção.

2.3.1 Produção de goma xantana

Goma xantana é um heteropolissacarídeo produzido por cultivo aeróbio, a 28°C aproximadamente, de culturas de *Xanthomonas campestris*, normalmente pelo patovar *campestris* (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001).

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

O meio de cultura consiste geralmente em glicose ou sacarose como fonte de carbono, e extrato de levedura, peptona, nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, e ainda fósforo e traços de outros minerais. O pH deve ser mantido próximo ao da neutralidade. (MAUGERI, 2001). Segundo GARCIA-OCHOA *et al.* (2000); CASAS *et al.* (2000) o meio de produção ótimo para xantana inclui: sacarose (40 gL⁻¹), ácido cítrico (2,1 gL⁻¹), sais de amônia, potássio, magnésio, sódio, zinco, ferro e cálcio, ácido bórico e ácido clorídrico concentrado, sendo o pH ajustado para 7,0. Glicose e sacarose são as fontes de carbono mais freqüentes, usadas em concentrações de 2-4%, pois altas concentrações inibem o crescimento.

SOUW & DEMAIN (1979) relatam que a melhor produção de goma xantana ocorreu com 1% de sacarose, 0,5% de frutose ou 0,5% de xilose com 2% de glicose no meio, sendo que a adição em excesso da sacarose não teve nenhum efeito prejudicial no crescimento e produção da goma xantana, mas que a adição de frutose ou xilose foi inibitório na produção e crescimento da bactéria. Sacarose mostrou uma maior produção de goma xantana, em relação aos outros açúcares estudados, sendo ligeiramente melhor que a glicose.

Nitrogênio pode ser fornecido nas formas orgânica ou inorgânica, sendo que a razão carbono:nitrogênio usada no meio de produção deve ser menor que a usada durante o crescimento (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; CASAS *et al.*, 2000).

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

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

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

Fontes de nitrogênio influenciam fortemente a produção de goma xantana. Glutamato, nitrato de sódio e nitrato de amônia foram testados nas fermentações de goma xantana, sendo que a produção foi maior com glutamato do que com as outras fontes de nitrogênio (SOUW & DEMAIN, 1979).

CASAS *et al.* (2000), verificaram que a concentração de nitrogênio influencia no aumento de biomassa, primeiramente aumentando conforme aumentava a concentração de nitrogênio, chegando a um máximo quando foi usado $1,144\text{g.L}^{-1}$ de NH_4NO_3 , a partir disso ocorria uma diminuição da biomassa com aumento da concentração do nitrogênio, verificaram também que não ocorreu nenhum efeito sobre a produção de goma xantana.

Glutamato é a melhor fonte de nitrogênio, usada em concentrações de 15 mM. Pequenas quantidades de ácidos orgânicos (succínico e cítrico) adicionados ao meio, melhoram a produção (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

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

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

As temperaturas empregadas para a produção de goma xantana podem variar de 25 a 34°C. Ambos, crescimento de biomassa e produção de goma xantana aumentam com a temperatura, rendendo um máximo à 28°C (CASAS, *et al.*, 2000; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Em temperaturas mais baixas entre 25° e 28°C obtém-se maior conteúdo de acetato do que em temperaturas mais altas compreendidas entre 31° e 34°C. Nenhuma tendência é observada no conteúdo de piruvato em diferentes temperaturas, porém se observa um maior grau de piruvilação a 28°C e um menor a 34°C. Com aumento da temperatura ocorre também um decréscimo no peso molecular médio da goma produzida (CASAS, *et al.*, 2000).

A maioria dos pesquisadores aponta o pH neutro como ótimo para o crescimento da *Xanthomonas campestris*, sendo que este decresce para 5,0 durante a produção de goma xantana, devido aos grupos ácidos presentes no polímero (GARCIA-OCHOA, *et al.*, 2000, PAPAGIANNI, *et al.*, 2001). O controle do pH melhora o crescimento celular mas não tem efeito sobre a produção de goma xantana, alguns autores sugerem que controle de pH não é necessário para este processo, mas outros recomendam o controle do pH neutro usando álcalis como KOH, NaOH e (NH₄)OH.

PAPAGIANNI, *et al.* (2001), verificaram que o pH do meio de cultura aumentou durante as fermentações, usando fermentador, quando foi variada as velocidades de agitação, alcançando um máximo de 9,5 quando foi utilizado 600rpm. Os valores de pH encontrados em fermentações realizadas com a goma xantana são contraditórios, assim como podem diminuir, podem também aumentar durante a fermentação dependendo da tensão residual e composição do meio.

Aeração é requerida para se obter produção de goma em processos fermentativos, aumentos nos níveis de agitação resultam em níveis de produção mais altos, o que ocorre também para o crescimento celular. Em baixas velocidades ocorrem limitações de oxigênio resultando em baixas produções e gomas com baixo peso molecular. Os efeitos benéficos

do aumento da agitação são atribuídos ao aumento da transferência de nutrientes e oxigênio necessários para a formação de goma xantana (PAPAGIANNI, *et al.*, 2001).

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

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

O processo de fermentação pode ser realizado utilizando substratos sólidos ou em meio líquido. A fermentação líquida em cultivo submerso é a mais comumente utilizada para obtenção de goma xantana por ser de fácil controle. Possibilitando a variação do meio de cultivo, fácil esterilização do meio, aeração estéril menos dispendiosa e a superfície bacteriana fica inteiramente exposta ao meio facilitando as trocas metabólicas (REGULY, 2000 apud PINTO, 2005).

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

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

Produção de goma xantana em meios alternativos vem sendo estudada visando melhorias no rendimento e na qualidade da goma produzida com diminuições expressivas nos custos de produção. NITSCHKE *et al.* (2001) estudaram diferentes formulações de meio

de cultura a base de soro de queijo (integral, filtrado e hidrolizado) para a produção de goma xantana pelo isolado *X. campestris* C₇L e verificaram que essa linhagem demonstrou capacidade de produzir goma com alta viscosidade em soro de queijo. ANTUNES *et al.* (2000^(a)) estudaram a relação entre viscosidade e composição química da goma xantana sintetizada por *X. campestris* pv *pruni* cepa 06 em meios convencionais e alternativos como soro de queijo e verificaram que em meios convencionais a goma xantana produzida possui qualidade superior a goma sintetizada em meio de soro de queijo.

2.4 Soro de Queijo

O soro de queijo é um líquido opaco, amarelo-esverdeado, resultante da precipitação de gorduras e caseína do leite durante a fabricação de queijos. Contém cerca de 55% dos sólidos existentes no leite integral original e representa cerca de 80% a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo. Possui uma DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) entre 30.000 a 60.000 de mg.L⁻¹, dependendo do processo utilizado na elaboração do queijo. Seu descarte diretamente em rios ou esgotos públicos atualmente não é permitido, mas em média, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de tratamento de esgoto equivale à poluição diária de cerca de 470 pessoas (ANDRADE & MARTINS, 2002).

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

As aplicações do soro são inúmeras, englobando as indústrias de lácteos, carnes, misturas secas (para condimentar), panificação, chocolate, aperitivos e bebidas, entre outras. Nos Estados Unidos 90% do soro, quando transformado em pó, é destinado à alimentação humana, o que em 2001 representou mais de 500.000 toneladas (CNPGL/EMBRAPA, 2002). Ainda assim, apenas cerca de 50% do soro produzido nos EUA e na Europa são utilizados na formulação de produtos, o restante é descartado (ANDRADE & MARTINS, 2002).

Este descarte além de trazer danos à natureza, corresponde também a um desperdício inaceitável diante de suas características nutricionais.

No Brasil o soro de queijo ainda é considerado um produto de qualidade inferior e de pouca importância sob o ponto de vista nutritivo. O RIISPOA (Regulamento de Inspeção

Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – Decreto 30.691/52), considera o soro de queijo como um produto para alimentação animal (CNPGL/EMBRAPA, 2002).

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

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

Tabela 1: Composição centesimal média do soro de queijo.

Componentes	Quantidade
Água	93,39 ± 0,44 %
Extrato Seco Total (EST)	6,61 ± 0,44 %
Gordura	0,43 ± 0,19 %
Extrato Seco Desengordurado (ESD)	
Proteína	0,78 ± 0,25 %
Lactose	4,90 ± 0,11 %
Minerais	1,59 ± 0,02 %
Sódio	0,13%
Potássio	0,14%
Cálcio	0,12%
Fósforo	0,10%
Nitrato	45ppm
Ferro	1ppm

FONTE: FRANCO (1982); FARRO & VIOTTO (2003).

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

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

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

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

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

2.5 Recuperação do Biopolímero

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

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

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

As células podem ser eliminadas fisicamente através de centrifugação. Os polímeros são recuperados por centrifugação e precipitados preferencialmente com solventes orgânicos solúveis em água como álcool ou acetona (MOREIRA *et al.*, 2003).

A quantidade de solvente necessário para a completa precipitação depende da força iônica e da composição do polímero apesar de não depender de sua concentração. A precipitação com solventes, resulta também em purificação parcial do polímero por eliminação dos componentes solúveis no solvente (PACE, 1991).

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

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

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

O polissacarídeo pode ser tratado, química, física ou biologicamente durante sua separação visando obter-se certas características especiais no produto final. Por exemplo, para aumentar sua dispersibilidade é tratado com dialdeídos; para aumentar sua viscosidade faz-se reagir com formaldeído e para torná-la compatível com outros polissacarídeos como a carboximetilcelulose (CMC), trata-se com celulasas (MAUGERI, 2001).

O polímero depois de seco pode ser moído, algumas gomas comerciais são diferenciadas por tamanho de partículas. Deve-se ter em conta que na moagem o calor gasto não degrade ou descolore o produto. O empacotamento usado deve ser impermeável porque a goma xantana é higroscópica e sujeita a degradação hidrolítica (GARCÍA-OCHOA, *et al.*, 2000).

2.6 Toxicidade e Aplicações da Goma Xantana

As propriedades toxicológicas e de segurança da goma xantana foram investigadas intensamente para determinar sua aplicação em alimentos e fármacos. A goma xantana não é tóxica, não provoca sensibilização nem irritação ocular e da pele (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). A FDA (Food and Drug Administration) dos EUA aprovou em 1969 como aditivo alimentício. Em 1980 a comunidade econômica europeia agregou a goma xantana à lista de emulsificantes/estabilizantes alimentícios permitidos (MORRIS, 1984).

Os biopolímeros bacterianos, em razão de sua origem, para serem utilizados em produtos para consumo humano, como fármacos, cosméticos e alimentos, devem, além de ter a aprovação prévia dos órgãos competentes, passar por rigoroso controle de qualidade (MOREIRA, *et al.*, 1998).

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

A obtenção de biopolímeros para o consumo humano é uma tarefa mais complexa do que para a utilização em outros produtos, uma vez que devem ser considerados seguros do ponto de vista alimentar e, portanto, satisfazer os severos códigos e legislações alimentares, atualmente em vigor. Uma amostra disso é que, apesar da pesquisa em polímeros produzidos por microrganismos ter sido iniciada há mais de três décadas, poucos biopolímeros foram aprovados para uso alimentar nos EUA: xantana produzida por *Xanthomonas campestris*, gelana por *Sphingomonas* e dextrana por *Leuconostoc*, e por último curdulana produzida pelas bactérias *Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes* e *Agrobacterium radiobacter* (PORTILHO, 2002).

MOREIRA (2000), utilizou goma xantana produzida pelas cepas 06 e 24 em cosmecêuticos (xampu e loção), verificando que a adição do polímero retardou a formação de precipitado no xampu sendo que as cepas estudadas foram mais eficientes que a xantana comercial. A maior viscosidade apresentada pelo xampu adicionado do polímero indica que a espuma formada durante a utilização do produto será mais estável, tornando o produto mais atrativo ao consumidor. Em relação às loções verificou uma consistência mais cremosa facilitando o espalhamento e uma maior resistência ao calor, mas com maior suscetibilidade à proliferação de fungos

Na indústria petrolífera é utilizada como aditivo para fluídos de perfuração. Na recuperação secundária de petróleo é adicionada para reduzir a permeabilidade e reduzir a mobilidade da água ao aumentar sua viscosidade (COTTRELL & KANG, 1978).

2.7 Reologia

A reologia é o estudo da deformação e do escoamento da matéria; sendo que a deformação aplica-se no caso da matéria sólida e o escoamento quando a matéria é líquida. No caso mais simples, a propriedade reológica de interesse no caso de sólidos é a sua elasticidade, e nos líquidos é a viscosidade, que pode ser interpretada como a resistência que um fluido oferece para escoar ou também como a medida da fricção interna de um fluido (PASQUEL, 1999).

Cálculos nos processos envolvendo fluxos de fluidos tais como tamanho de bomba, extração ou filtração, requer um conhecimento de dados reológicos e a reologia de um produto é necessária para a análise das condições de fluxo em vários processos de alimentos. Muitos fatores incluindo a concentração das gomas, temperatura, dissolução, tratamento térmico prévio e presença de eletrólitos podem afetar a reologia de um fluido de alimentos contendo gomas (MARCOTTE *et al.*, 2001).

Viscosidade é uma propriedade reológica definida como a medida da fricção interna de um fluido, ou seja, sua resistência a fluir. Ela se torna aparente quando uma camada de fluido move-se em relação à outra camada. Assim, à medida que aumenta a viscosidade do fluido, aumentam as forças de atrito e é necessário mais energia para que haja escoamento. Conseqüentemente, fluidos altamente viscosos requerem maior força para se moverem do que materiais menos viscosos (LEWIS, 1993).

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

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

A goma xantana é extremamente pseudoplástica (a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento) e esta é uma característica muito desejada em diversas situações (XUEWU *et al.*, 1996). Efetivamente, polissacarídeos que possuem comportamento pseudoplástico provocam menos sensação de gomosidade na boca do que aqueles com comportamento newtoniano (viscosidade se mantém inalterada com o aumento da taxa de deformação) (MORRIS, 1984). Sua associação com hidrocolóides, como proteínas e outros biopolímeros, pode potencializar o efeito pseudoplástico (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

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

A estrutura química de cada biopolímero, bem como os grupos substituintes que ele possui determinam suas características reológicas e, portanto, suas potenciais aplicações (PACE, 1991).

As propriedades reológicas das soluções mudam com a natureza do polímero, e dependem do peso molecular médio, da estrutura molecular, dos grupos acetil ou piruvato. (CASAS *et al.*, 2000);

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

Os sais influenciam na viscosidade das soluções aquosas de goma xantana, sendo que alguns sais aumentam a viscosidade das soluções. Isto é resultado da estabilização da estrutura ordenada da goma xantana pelo aumento da associação intermolecular. No entanto, concentrações de biopolímero abaixo de 0,2%, a adição de sais causa leve diminuição na viscosidade. A viscosidade aumenta em altas concentrações de xantana ou quando uma grande quantidade de sais é adicionada. Isto se deve provavelmente ao aumento da interação entre as moléculas do biopolímero (SMITH; & PACE, 1982; XUEWU *et al.*, 1996).

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

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

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

Muitos modelos tem sido usados para caracterizar o comportamento do fluido de soluções de goma, entre eles o modelo "power law" que tem sido freqüentemente usado para determinação das propriedades reológicas de fluídos alimentícios. Esse modelo descreve os efeitos da taxa de cisalhamento na viscosidade das soluções de goma xantana (XUEWU *et al.*, 1996; KAYACIER & DOGAN, 2005)

Utilizam-se diferentes sistemas de unidades para expressar viscosidade, tais como o Sistema Internacional (N.s.m^{-1} ; Pa.s; $\text{Kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$), o Sistema Britânico (lb-s/pies^2 ; slug/pie-s), Sistema Imperial (lbf ft^{-2}) e o Sistema CGS (P, dyn.s.cm^{-2}) (LEWIS, 1993).

2.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é uma técnica que está sendo usada à cerca de 95 anos, e tem se mostrado importante para a análise de materiais com as mais variadas estruturas e propriedades físicas. No final dos anos 60 começou a se desenvolver a cromatografia denominada HPLC ou CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), trata-se de uma técnica de ultra-microanálise, que, dependendo da substância e do detector empregado pode quantificar massas de componentes inferiores a 10^{-8} g (CIOLA, 1998).

A CLAE utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. Emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob alta pressão. Apresenta capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. É importante que a amostra seja solúvel em fase móvel e não sofra decomposição, para que possa ser transportada através da coluna sem que seus componentes se modifiquem. Quando possível, o solvente da amostra é a própria fase móvel ou um dos seus componentes para que ela não sofra precipitação no injetor ou na coluna, o que provocará queda de resolução na separação (COLLINS, *et al.*, 1995)

A análise de biopolímeros envolve basicamente a análise de monossacarídeos, determinação da seqüência destes monossacarídeos, determinação da posição das ligações interglicosídicas, que em adição incluem análises de outros grupos funcionais, com reações de derivação, e conseqüente caracterização, identificação e quantificação. Embora exista uma variedade de métodos instrumentais, químicos e enzimáticos usados na análise de carboidratos, nenhum método é completo quando usado individualmente. Por causa da diversidade somada a complexidade da composição química dos heteropolissacarídeos produzidos por microrganismos, a identificação e quantificação requerem uma série de procedimentos analíticos complexos. Entretanto, uma primeira classificação pode ser obtida com base na composição dos monossacarídeos após clivagem das ligações glicosídicas. (DRUZIAN, 2000).

A cromatografia líquida pode ser usada por injeção direta da amostra de EPS hidrolizada no CLAE com detecção de índice de refração para açúcares e, ultravioleta (210nm), ou arranjo de diodos para ácidos (210nm, com monitoração de outros comprimentos de ondas) embora a sensibilidade do arranjo de diodo seja menor, pode-se fazer a comparação dos espectros no início, meio e fim de cada pico, obtendo-se assim a pureza do pico cromatográfico (DRUZIAN, 2000). O uso de colunas com fase estacionária ligada a NH_2 com a mistura acetonitrila:água como eluente em CLAE tem sido muito

utilizada para separação de carboidratos e polióis com detecção de índice de refração. (WEI, 1990).

O primeiro passo na análise de biopolímeros é a clivagem das ligações entre as unidades básicas que os compõem. Isto é normalmente realizado por hidrólise ácida e/ou enzimática. Para uma identificação precisa assim como para uma análise quantitativa das unidades que compõem o EPS é necessário que a hidrólise ácida seja realizada em condições suficientemente brandas para não causar degradação dos açúcares, mas permitindo a quebra de todas as ligações glicosídicas (DRUZIAN, 2000).

Os agentes de hidrólise mais comumente usados são ácido sulfúrico, ácido trifluoracético (TFA), ácido clorídrico ou ácido sulfúrico em metanol absoluto, ácido fluorídrico, e vários outros usados em clivagem reductiva. A maior desvantagem do ácido sulfúrico está na incapacidade para hidrolisar completamente ligações α (1-4) de ácido poliglucurônico e na dificuldade de remover o ácido após hidrólise. Hidrólise com TFA (2M, 1 hora, 121°C) que pode ser facilmente removido por evaporação após hidrólise, é relatado ser insuficiente para hidrolisar ligações α (1-4) de polímeros celulósicos e polissacarídeos capsulares de *Haemophilus influenzae* e glicosaminoglicanas (DUDMAN, 1976).

Mudanças no processo de fermentação como a utilização de diferentes espécies, patovares e cepas de *Xanthomonas*, composição do meio e condições operacionais podem ocasionar variações na estrutura molecular do biopolímero sintetizado (PINTO, 2005).

As espécies e patovares da bactéria utilizados no processo de fermentação influenciam na composição do biopolímero formado. A goma xantana comercial sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv *campestris* é composta de glicose, manose, ácido glucurônico, grupos acetil e piruvato. Ocorre a presença de ramnose e xilose nos polissacarídeos produzidos pelo patovar *juglandis* e *phaseoli*, respectivamente. A goma xantana sintetizada pelo patovar *pruni* apresenta o monossacarídeo ramnose em sua composição (Slonecker e Jeanes, 1962; Lowson e Symes, 1977 apud SOUZA & VENDRUSCULO, 2000).

Ácido glucurônico e glicose foram encontrados nas amostras de clairana, gelana e xantana, sendo que nas amostras de clairana foram identificados ainda os monossacarídeos galactose e fucose, na gelana ramnose e na xantana manose (MOREIRA, *et al.*, 1998)

A presença de ramnose na composição da goma xantana é uma característica desejável, já que nas gomas xantana das quais faz parte possuem capacidade de formar géis verdadeiros. A goma xantana comercial não apresenta ramnose na sua composição (MCNELLY & KANG 1977).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas as linhagens *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 e *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* IBSBF 1182, obtidas a partir da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico – Campinas – SP.

3.2 Soro de Queijo

O soro de queijo utilizado como fonte de carbono e nitrogênio foi cedido pelo laticínio da COCEL (Cooperativa Central do Alto Uruguai) em Erechim – RS.

3.3 Metodologia

3.3.1 Manutenção dos microrganismos e Caracterização

As linhagens foram mantidas em meio YM contendo (g.L⁻¹) extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0; agar 20,0; água destilada q.s.p.; pH 7,2 (JEANNES *et al.*, 1976), e em meio YM líquido acrescido de glicerol (agente crioprotetor) para armazenamento a -80°C. Para preservar as culturas e diminuir o risco de alteração no perfil genético, foi realizado o congelamento das linhagens em freezer -80°C (ROTTAVA, 2005).

As linhagens inoculadas em agar YM foram incubadas para o crescimento celular em estufa por 24 horas a 28°C ± 2°C e após este período armazenadas a 4°C. Foram realizados repiques a cada 30 dias. Através do plaqueamento foi possível caracterizar visualmente as colônias de *X. campestris* estudadas verificando a coloração e aspectos destas.

3.3.2 Determinações físico-químicas no soro de queijo

Para cada experimento retirou-se uma amostra de soro de queijo para monitorar as características físico-químicas a fim de verificar diferenças entre soro de queijo prato e soro de queijo mussarela. O soro foi coletado em condições reais do processamento dos queijos, sendo retirado a uma temperatura em torno de 40°C, após armazenado sob refrigeração e utilizado para análises e para fermentação no mesmo dia.

3.3.2.1 pH

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

3.3.2.2 Acidez Dornic

A acidez foi realizada através de titulometria de neutralização, utilizando-se solução padrão de NaOH 0,11N e indicador fenolftaleína, segundo a metodologia de TRONCO (1997).

3.3.2.3 Gordura

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

3.3.2.4 Proteína

Foi utilizado método de Kjeldahl, que consiste na destruição da matéria orgânica pela sua digestão com ácido sulfúrico, passando o nitrogênio presente para a forma de sulfato de amônio, conhecido também por método NKT (Nitrogênio Kjeldahl Total) (TRONCO, 1997).

3.3.2.5 Lactose

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

3.3.2.6 Minerais – (cinzas)

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

3.3.2.7 Nitrato

Foi realizada através da redução de nitratos a nitritos pela ação do cádmio. A determinação de nitritos é feita pela reação de Griess-Ilosvay. Em amostras com alto teor de proteínas deve ser feita uma desproteinização (IAL, 1985).

3.3.3 Produção de células

O inóculo foi preparado retirando-se assepticamente uma alçada de cultura crescida em meio YM e adicionando-se em erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de meio YM líquido com pH ajustado para 7,2. Os frascos foram incubados em agitador orbital, com agitação de 120 rpm a temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

3.3.4 Produção de goma xantana

Para os ensaios de produção de goma xantana foi utilizado soro de leite obtido a partir de queijo prato e de queijo mussarela. O soro utilizado era proveniente dos queijos elaborados no dia.

Foi utilizado erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de meio de fermentação contendo: soro de queijo, sulfato de magnésio, fosfato de potássio em concentrações determinadas pelos planejamentos de experimentos realizados (item 3.3.5). O pH do meio foi ajustado para 7,2. O meio foi autoclavado a $121^{\circ}\text{C}/15\text{min}$, sendo que após a autoclavagem apresentou aspecto turvo com coloração mais escura. Ao meio de fermentação foi adicionado 20 mL de inóculo, o volume final utilizado no experimento foi de 100 mL.

Os erlenmeyers foram incubados em agitador orbital com agitação de 180 rpm a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

3.3.5 Planejamentos experimentais

Visando definir os níveis de estudo e auxiliar na montagem da matriz do planejamento de experimentos foram realizados inicialmente quatro experimentos para verificar a viabilidade da produção de goma xantana nos dois tipos de soro de queijo. Todos os ensaios foram realizados utilizando inóculo em meio YM $28^{\circ}\text{C}/120\text{ rpm}/24\text{h}$ e meio de fermentação com soro de queijo 80 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% e K_2HPO_4 0,5%; $28^{\circ}\text{C}/180\text{ rpm}/72\text{h}$. Os experimentos foram efetuados de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Ensaios preliminares realizados para verificar a produção de goma xantana nos dois tipos de soro de queijo e nas duas linhagens de *X. campestris* em estudo.

Testes	<i>X. campestris</i>	Soro de Queijo
1	1230	Mussarela
2	1182	Mussarela
3	1230	Prato
4	1182	Prato

Após realização dos testes iniciais, foram efetuados quatro planejamentos variando a linhagem da bactéria e o tipo de soro. Nos planejamentos 1 e 3 foi utilizada *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* sendo que no 1 utilizou-se soro de queijo mussarela e no 3 soro de queijo prato. Nos planejamentos 2 e 4 foi utilizada *X. campestris* pv *manihotis*, sendo que no 2 utilizou-se soro de queijo mussarela e no 4 soro de queijo prato.

Foram realizados quatro planejamentos fatoriais completos 2^3 , com triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos por planejamento. A Tabela 3 apresenta as variáveis e níveis estudados

Tabela 3 - Variáveis e níveis estudados nos planejamentos experimentais 2^3

Variáveis independentes/Níveis	-1	+1	0*
Concentração soro/sacarose	40:40	80:0	60:20
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01%	0,1%	0,055%
K ₂ HPO ₄	0,2%	1,0%	0,6%

* Ponto central

A resposta avaliada foi produtividade de biopolímero e os cálculos para verificar o efeito das variáveis na resposta foram feitos com o auxílio do programa Statistica 5.1.

De acordo com os resultados destes primeiros planejamentos, foram realizados novos planejamentos variando-se a linhagem da bactéria e o tipo de soro de leite, deslocando-se os níveis estudados de acordo com a análise dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta produtividade avaliada.

Foi realizado então um planejamento fatorial 2^2 , com triplicata do ponto central, totalizando sete ensaios. Nestes experimentos foi fixado a quantidade de soro de leite em 80 mL. As variáveis e os níveis estudados estão apresentados na tabela 4. As condições de fermentação são descritas nos itens 3.3.3 e 3.3.4.

Tabela 4- Variáveis e níveis estudados nos planejamentos experimentais 2² com meio de soro de queijo.

Variáveis independentes/Níveis	-1	+1	0*
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05%	0,15%	0,1%
K ₂ HPO ₄	0,5%	1,5%	1,0%

* Ponto central

A resposta avaliada foi produtividade de biopolímero e os cálculos para verificar o efeito das variáveis na resposta foram feitos com o auxílio do programa Statistica 5.1.

Baseando-se nos planejamentos anteriores otimizou-se o meio para produção de goma xantana da seguinte forma: 80ml Soro de queijo; 0,1% de MgSO₄.7H₂O; 2% de K₂HPO₄. pH ajustado para 7,2± 0,2; temperatura de 28°C ± 2°C; tempo de fermentação de 72h; agitação 180rpm. Nestas condições realizou-se várias repetições com o objetivo de produção de goma para análises de viscosidade aparente e cromatografia.

3.3.6 Recuperação da goma xantana

O caldo de fermentação foi centrifugado em uma velocidade de 7000 rpm por 30 minutos a temperatura ± 4°C para remoção das células. As células colocadas em placas de petry pesadas e foram secas em estufa a uma temperatura de 50°C por 24 horas, após foram pesadas até peso constante, sendo calculado o peso seco de massa celular.

Após a retirada das células ao sobrenadante foi adicionado etanol 92,8°GL (1:3 v/v) para precipitação da goma, esta solução foi armazenada sob refrigeração ± 4°C durante 24 horas. Transcorrido o tempo de refrigeração as amostras foram centrifugadas a 7000 rpm, durante 30 minutos, a temperatura de ± 4°C, para recuperação do biopolímero precipitado que foi seco em estufa (50°C/24 horas), ressuspenso em água milli-q e liofilizados. O polissacarídeo foi armazenado em frascos plásticos vedados. Para a realização das análises físico-químicas (viscosidade aparente, cromatografia) o polissacarídeo foi dialisado por 48horas contra água Milli-Q estéril, sendo novamente liofilizado e armazenado em frascos vedados (PACE, 1991; FIALHO, *et al.*, 1999).

Para centrifugação foi utilizada uma centrífuga refrigerada microprocessada de bancada NT 825, marca Nova Técnica.

3.3.7 Análise do consumo de lactose

Com o objetivo de verificar o consumo do substrato lactose, foi conduzida uma fermentação com agitação de 180rpm, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 72 horas, retirando-se amostras a cada 12 horas, com cada uma das linhagens e com cada um dos tipos de soro estudados.

O consumo do substrato lactose foi medido através da concentração deste, presentes no caldo de fermentação, sendo determinado pelo método do DNS (MILLER, 1959; NITSCHKE, 2001).

3.3.8 Análise de viscosidade aparente

Foi efetuada análise de viscosidade aparente do caldo de fermentação antes e após a retirada de células, retirando-se amostras a cada 12 horas.

Foi realizada análise de viscosidade aparente de soluções aquosas e salinas das gomas sintetizadas pelas duas linhagens e pelos dois tipos de soro estudados, na concentração de 3%, para análise a 25°C .

Para as análises de viscosidade aparente das soluções salinas de gomas a 3% foram utilizados os seguintes sais: cloreto de cálcio, cloreto de potássio e cloreto de sódio. Foi efetuada análise de cada goma produzida em solução aquosa 3% adicionado de 0,1% dos sais citados separadamente.

Para as análises de viscosidade aparente foi utilizado o reômetro digital marca Brookfield, modelo LVDV III+, acoplado a um banho-maria, marca Brookfield, modelo TC-502P; utilizando-se o adaptador para pequenas amostras, *spindle* 18, que, segundo o manual do fabricante, permite variar a taxa de cisalhamento de 0 a 264s^{-1} e a viscosidade de 1,3 a 30000 cP. As leituras foram realizadas a intervalos de 5 segundos, variando-se a taxa de cisalhamento ($0-264-0\text{s}^{-1}$).

As unidades de medida utilizadas foram: centipoise (cP) = m.Pa.s, para viscosidade aparente, 1/segundo (s^{-1}) para taxa de cisalhamento e dyna/centímetro quadrado (D/cm^2) para tensão de cisalhamento.

Todas as análises de viscosidade aparente foram realizadas em triplicata.

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

3.3.9 Cromatografia líquida de alta eficiência

3.3.9.1 Hidrólise do polissacarídeo

Foram pesadas 0,01g de amostra das gomas produzidas e dialisadas em tubos de ensaio previamente testados para não ocorrer evaporação, após foram hidrolisadas com ácido trifluoracético (TFA) (0,5ml; TFA 1M; 100°C por 16horas).

As soluções contendo o hidrolizado foram evaporadas com N₂ para retirada do TFA.

3.3.9.2 Análise cromatográfica (CLAE)

Foi utilizado cromatógrafo líquido modelo agilent technologies -1100 series, para determinação dos monossacarídeos.

As amostras hidrolisadas e evaporadas foram dissolvidas em 1ml de acetonitrila:água (75:25), filtradas em filtro de membrana com 0,22µm, e colocadas em vials para posterior análises de monossacarídeos. Para determinação de açúcares foi utilizado coluna Zorbax NH₂, 4,6mm ID x 250mm, detector UV 254nm, fase móvel acetonitrila:água (75:25), fluxo de 0,5ml/min.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características Morfológicas da Colônia

Através do plaqueamento da cultura em ágar YM verificou-se que as linhagens estudadas apresentaram formato de bastonetes, e têm coloração amarela. Este aspecto foi observado por ROTTAVA (2005), quando trabalhou com as linhagens *X. campestris* 1230 e 1182.

As Figuras 2 e 3 apresentam fotografias das colônias das linhagens de *Xanthomonas* sp estudadas.



Figura 2 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 horas, de *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230.



Figura 3 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 horas, de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* 1182.

As colônias de *Xanthomonas* sp são geralmente amarelas, lisas e viscosas (GARCÍA-OCHOA, *et al.*, 2000). Observa-se nas figuras 2 e 3 que a linhagem 1230 possui pigmentação menos intensa ou ausência de pigmentação em relação à linhagem 1182, esta característica também foi descrita por ROTTAVA (2005).

A pigmentação das colônias deve-se as xantomonadinas que são pigmentos amarelos característicos do gênero *Xanthomonas*, este pode estar ausente quando ocorre alguma degradação ou mutação. Estes pigmentos podem estar relacionados a fatores de difusibilidade de baixo peso molecular (feromônio), bem como na regulação da síntese de enzimas extracelulares e a produção do polissacarídeo extracelular (POPLAWSKY *et al.*, 2000).

4.2 Caracterização do Soro de Queijo

A amostra de soro foi coletada no laticínio da COCEL (Cooperativa Central do Alto Uruguai) em Erechim-RS, em condições reais de processamento, sendo o mesmo utilizado para produção do polissacarídeo.

A caracterização do soro foi efetuada para verificar possíveis diferenças entre os dois tipos de soros estudados que poderiam acarretar alterações na produção e qualidade da goma xantana produzida.

Na Tabela 5 podemos verificar a caracterização dos dois tipos de soros utilizados neste estudo.

Tabela 5 – Caracterização do soro de queijo mussarela e do soro de queijo prato.

Análise	Mussarela*	Prato*
pH	6,25	6,44
Acidez	20°D	15°D
Proteína	0,833% ^a	0,863% ^a
Gordura	0,743% ^b	0,766% ^b
Lactose	4,270% ^c	3,670% ^c
Cálcio	36,56mg/100g ^d	45,40mg/100g ^d
Ferro	0,072mg/100g ^e	0,074mg/100g ^e
Potássio	64,18mg/100g ^f	69,99mg/100g ^f
Magnésio	6,05mg/100g ^g	6,33mg/100g ^g
Nitrato	19,18g.L ^{-1 h}	19,05g.L ^{-1 h}

* média das caracterizações realizadas. Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Através da caracterização do soro podemos verificar que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o soro de queijo prato e o soro de queijo mussarela, em relação à proteína, gordura, lactose e minerais. O soro de mussarela apresentou acidez mais elevada decorrente do processo de fabricação pelo uso de fermentos lácteos mais acidificantes.

Os valores de proteína encontrados neste trabalho são semelhantes aos descritos por FARRO & VIOTTO (2003) onde apresentaram valores de 0,86% de proteínas, já em relação à lactose ficam abaixo dos citados por esses autores que é de 4,59% em soro de queijo prato; percentuais esses também citados por TRONCO (1997).

SERPA (2005) obteve valores de lactose entre 4,82 e 5,43%, proteína entre 0,77 a 0,91%, acidez de 12,23°D e pH 6,73; trabalhando com soro de mussarela, novamente os valores de proteína estão de acordo com os encontrados neste trabalho e os valores de lactose encontrados ficam abaixo dos citados por esse autor.

FARRO & VIOTTO (2003) encontraram valores para os minerais potássio, cálcio e ferro em média de 0,14%; 0,12% e 1ppm respectivamente, sendo que neste trabalho encontrou-se valores de potássio de 0,064% para soro de queijo mussarela e 0,069% para soro de queijo prato; em relação ao cálcio foi encontrado 0,036% e 0,045% e ferro 0,72ppm e 0,74ppm para soro de queijo mussarela e soro de queijo prato respectivamente. Essas diferenças encontradas em relação à literatura estão relacionadas com o tipo de processamento dos queijos e também com as características do leite utilizado, o que está de acordo com VEISSEYRE (1988) que diz que a variação na composição de minerais, podem ser devido a raça do animal, fase de lactação, alimentação dos animais e tipo de queijo processado.

4.3 Experimentos Preliminares

Foram realizados quatro experimentos com a finalidade de definir as condições de fermentação e recuperação do polímero, bem como verificar a produção de goma xantana em meio contendo soro de queijo. Os experimentos foram realizados segundo procedimento descrito no item 3.3.5.

Sabe-se através da literatura que o principal problema na produção de goma xantana a partir de soro de queijo é a baixa capacidade de utilização da lactose pela *X. campestris*, devido a pouca expressão da enzima β -galactosidase da bactéria, por esse motivo efetuou-se esses experimentos preliminares para verificar se as duas linhagens de *Xanthomonas* escolhidas tinham capacidade de produzir goma xantana em meio contendo soro de queijo.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados de produção de goma xantana nas duas linhagens e nos dois tipos de soro estudados.

Tabela 6 – Experimentos realizados para verificar a produção de goma xantana em diferentes soro de queijo utilizados como meio e com *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 e *X. campestris* pv *manihotis* 1182.

Experimento	Produção (g.L ⁻¹)
Soro de queijo prato <i>X. campestris</i> 1230	9,06
Soro de queijo prato <i>X. campestris</i> 1182	7,81
Soro de queijo mussarela <i>X. campestris</i> 1230	11,01
Soro de queijo mussarela <i>X. campestris</i> 1182	13,70

Condições de produção: 28°C; 180rpm; 72horas.

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram que ocorreu produção de goma nas duas linhagens selecionadas e em ambos os soros de queijo, sendo que a produção foi maior no soro de queijo mussarela. Portanto, esses resultados mostram que as duas linhagens escolhidas para esse estudo possuem capacidade de utilizar a lactose como fonte de carbono.

4.4 Produção de Goma Xantana

Os experimentos foram realizados utilizando-se meio YM líquido para o inóculo e soro de queijo como meio para a produção de biopolímero, conforme descrito nos itens 3.3.3 e 3.3.4. As fermentações foram conduzidas em agitador orbital à temperatura de 28°C ±2°C, com agitação de 120 rpm, por 24 horas para produção do inóculo e, para a produção da goma, agitação de 180 rpm, por 72 horas. Foram avaliadas nos experimentos a produtividade de goma xantana e a concentração de massa celular durante 72 horas de fermentação.

Através do planejamento experimental buscou-se maximizar a produção de biopolímero dentro das faixas estudadas. Nas Tabelas 7, 8, 9 e 10 apresenta-se a matriz do planejamento fatorial 2³ com triplicata do ponto central e as respostas produção e produtividade de goma xantana. Verifica-se que a maior produtividade (0,3307g.L⁻¹.h⁻¹) foi obtida em meio de soro de queijo mussarela na linhagem 1182, que corresponde ao planejamento 2, que pode ser visto na Tabela 8.

Os dados obtidos nos planejamentos 1, 2, 3 e 4 apresentados nas Tabelas 7, 8, 9 e 10 foram tratados estatisticamente. Foram calculados os coeficientes de regressão e o

desvio padrão, onde observou-se que apenas no planejamento 3 ocorreu efeito positivo para variável fosfato de potássio com ($p < 0,05$) sendo que nos demais planejamentos nenhuma das variáveis apresentaram efeitos significativos, o que pode ser observado nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

Nas Figuras 4, 5, 6 e 7 são apresentados os efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção de goma xantana.

Tabela 7 – Matriz do planejamento experimental 1 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana com *Xathomonas campestris pv mangiferaeindicae* 1230 e soro de queijo mussarela.

Ensaio	Soro/Sacarose (ml:g)	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Produção (g.L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Células (g)
1	-1 (40:40)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	4,49	0,0624	0,531
2	+1 (80:0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	10,22	0,1419	0,387
3	-1 (40:40)	+1 (0,1)	-1 (0,2)	4,52	0,0628	0,479
4	+1 (80:0)	+1 (0,1)	-1 (0,2)	12,58	0,1747	0,596
5	-1 (40:40)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	16,80	0,2333	0,343
6	+1 (80:0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	14,36	0,1994	1,047
7	-1 (40:40)	+1 (0,1)	+1 (1,0)	16,40	0,2278	0,495
8	+1 (80:0)	+1 (0,1)	+1 (1,0)	10,82	0,1503	0,899
9	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	15,61	0,2168	0,219
10	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	14,30	0,1986	0,421
11	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	10,74	0,1498	0,731

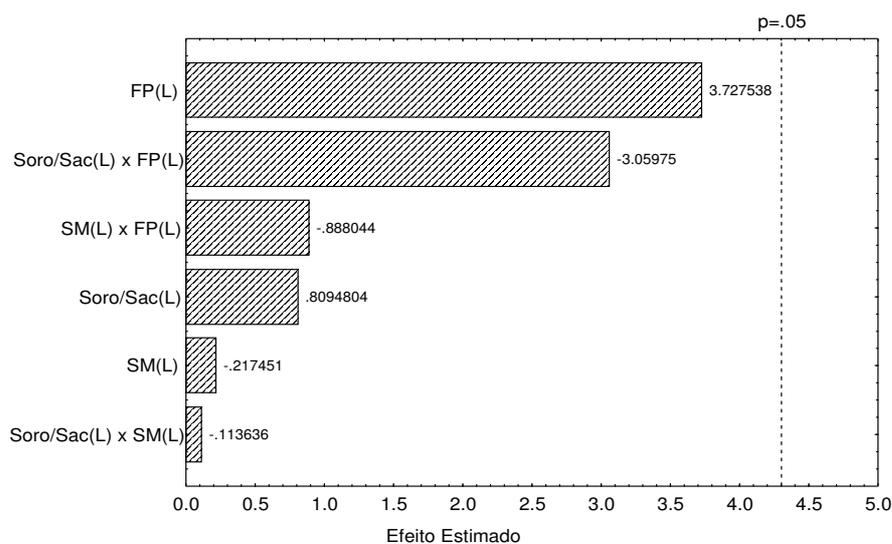


Figura 4 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana. **Onde:** FP - fosfato de potássio e SM - sulfato de magnésio.

Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental 2 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana com *Xathomonas campestris pv manihotis* 1182 em soro de queijo mussarela

Ensaio	Soro/Sacarose (ml:g)	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Produção (g.L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Células (g)
1	-1 (40:40)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	5,45	0,0757	0,220
2	+1 (80:0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	7,08	0,0983	0,480
3	-1 (40:40)	+1 (0,1)	-1 (0,2)	9,88	0,1372	0,381
4	+1 (80:0)	+1 (0,1)	-1 (0,2)	6,06	0,0842	0,636
5	-1 (40:40)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	13,43	0,1865	0,629
6	+1 (80:0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	17,89	0,2485	0,559
7	-1 (40:40)	+1 (0,1)	+1 (1,0)	14,33	0,1990	0,565
8	+1 (80:0)	+1 (0,1)	+1 (1,0)	23,81	0,3307	0,787
9	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	19,22	0,2669	0,449
10	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	10,93	0,1518	0,151
11	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	14,56	0,2022	0,799

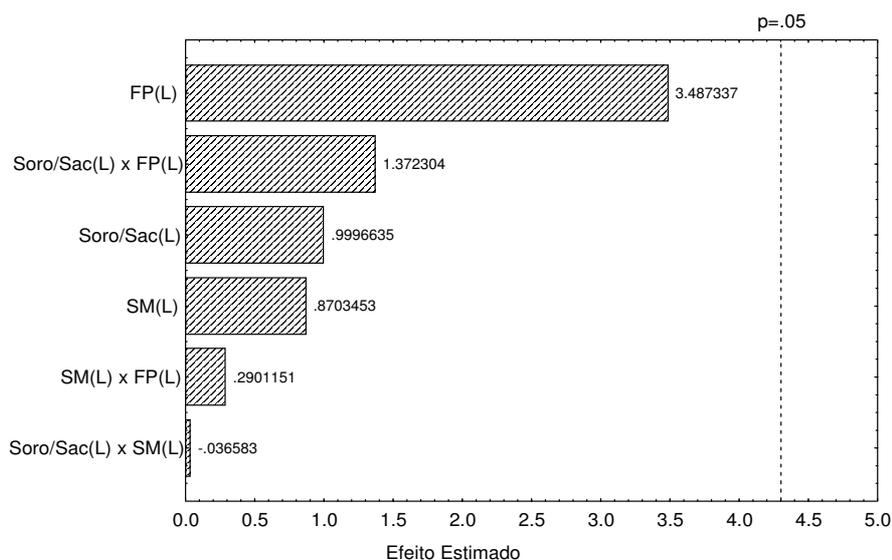


Figura 5 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana **Onde:** FP - fosfato de potássio e SM - sulfato de magnésio.

Tabela 9 – Matriz do planejamento experimental 3 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana com *Xathomonas campestris pv mangiferaeindicae*1230 e soro de queijo prato

Ensaio	Soro/Sacarose (ml:g)	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Produção (g.L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Células (g)
1	-1 (40:40)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	6,12	0,0850	0,057
2	+1 (80:0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	7,46	0,1036	0,141
3	-1 (40:40)	+1 (0,1)	-1 (0,2)	7,94	0,1103	0,018
4	+1 (80:0)	+1 (0,1)	-1 (0,2)	10,41	0,1446	0,246
5	-1 (40:40)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	12,03	0,1671	0,128
6	+1 (80:0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	19,17	0,2663	0,236
7	-1 (40:40)	+1 (0,1)	+1 (1,0)	15,34	0,2131	0,171
8	+1 (80:0)	+1 (0,1)	+1 (1,0)	20,83	0,2893	0,316
9	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	14,29	0,1985	0,153
10	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	9,54	0,1325	0,150
11	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	10,61	0,1474	0,140

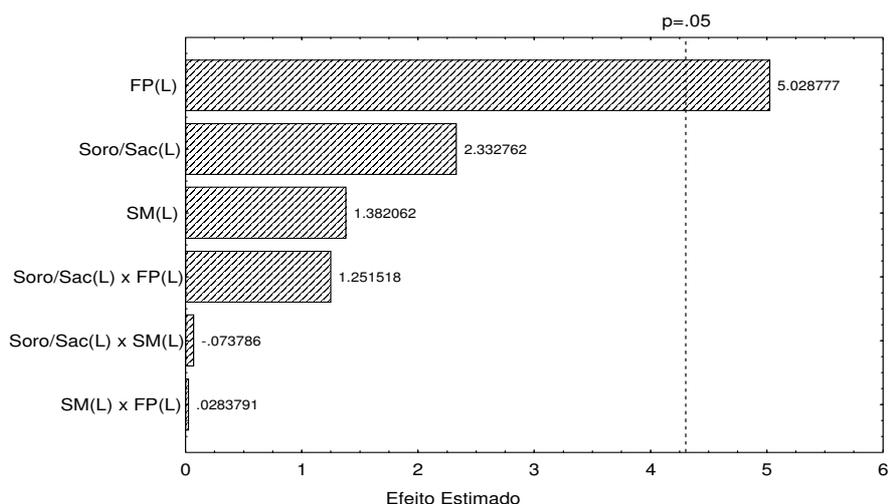


Figura 6 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana **Onde:** FP - fosfato de potássio e SM - sulfato de magnésio.

Tabela 10 – Matriz do planejamento experimental 4 (valores codificados e reais) com respostas de produção e produtividade de goma xantana com *Xathomonas campestris* pv *manihotis* 1182 e soro de queijo prato

Ensaio	Soro/Sacarose (ml:g)	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Produção (g.L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Células (g)
1	-1 (40:40)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	12,55	0,1743	0,236
2	+1 (80:0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	5,96	0,0828	0,173
3	-1 (40:40)	+1 (0,1)	-1 (0,2)	10,06	0,1397	0,330
4	+1 (80:0)	+1 (0,1)	-1 (0,2)	9,44	0,1311	0,692
5	-1 (40:40)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	10,89	0,1513	0,162
6	+1 (80:0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	14,61	0,2029	0,318
7	-1 (40:40)	+1 (0,1)	+1 (1,0)	12,94	0,1797	0,010
8	+1 (80:0)	+1 (0,1)	+1 (1,0)	17,75	0,2465	0,999
9	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	12,50	0,1736	0,162
10	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	8,01	0,1113	0,144
11	0 (60:20)	0 (0,055)	0 (0,6)	10,11	0,1404	0,164

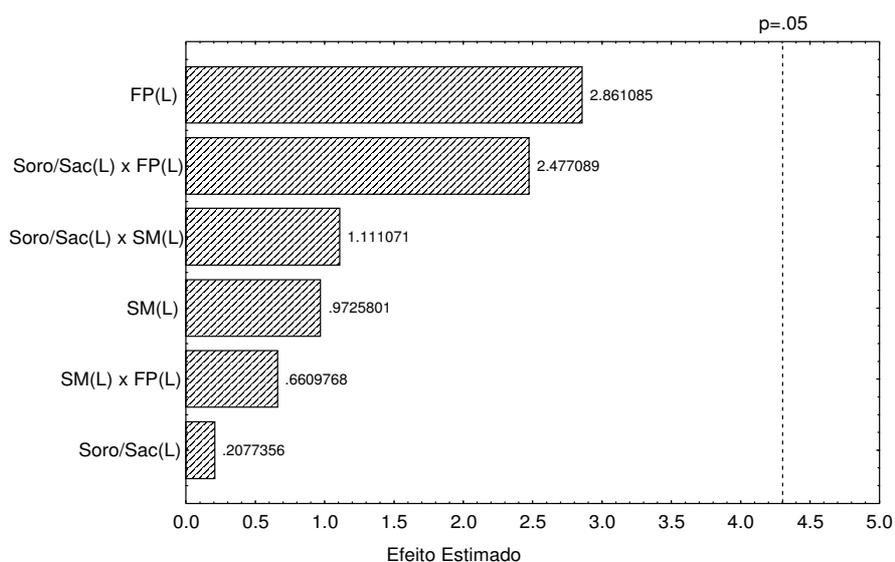


Figura 7 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana **Onde:** FP - fosfato de potássio e SM - sulfato de magnésio.

Verificou-se que as maiores produtividades, com exceção do planejamento 1, ocorreram no ensaio 8 onde tinha-se os níveis máximos de fosfato de potássio e sulfato de magnésio e somente soro de queijo como fonte de carbono. Baseado neste fato efetuou-se novos planejamentos onde foram elevadas as concentrações de sulfato de magnésio, fosfato de potássio. No novo planejamento foi retirada a sacarose do meio, utilizada como suplemento da fonte de carbono, já que um dos objetivos do trabalho foi maximizar o uso de rejeitos industriais, no caso soro de queijo que possui lactose para ser utilizada como macronutriente.

Os dados obtidos nos planejamentos 5, 6, 7 e 8 apresentados nas Tabelas 11, 12, 13 e 14 foram tratados estatisticamente. Foram calculados, os coeficientes de regressão e os desvios padrões, onde observou-se que apenas o planejamento 8 permitiu a construção da superfície de resposta conforme mostrado na Figura 11, os demais planejamentos não obtiveram variáveis com efeitos significativos, o que podemos verificar nas Figuras 8, 9 e 10.

Através da superfície de resposta (Figura 11) podemos concluir que com o aumento da variável fosfato de potássio ocorre um aumento na produção de goma xantana. Este comportamento também foi verificado por SOUW & DEMAÏN (1979), porém observaram também um aumento na viscosidade da goma produzida quando fosfato de potássio era utilizado, o que não aconteceu neste trabalho.

Neste estudo o meio de fermentação foi suplementado com sulfato de magnésio e fosfato de potássio, o que também aconteceu no estudo efetuado por NITSCHKE *et al.*, (2001) onde trabalharam com soro de leite integral suplementado com $MgSO_4$ e K_2HPO_4 .

No trabalho realizado por KALOGIANNIS *et al.* (2003), foi verificado que a adição de K_2HPO_4 no meio tem um efeito positivo no crescimento de goma xantana e na produção de biomassa, obtendo uma produção de $53g.L^{-1}$ em 24h de incubação com $175g.L^{-1}$ de melão e $4g.L^{-1}$ de K_2HPO_4 . Entre os aditivos investigados por esses autores apenas fosfato provou ter efeito positivo na produção de goma. O resultado indica que K_2HPO_4 serve como agente redutor, reduzindo as flutuações do pH da cultura, bem como nutriente para o crescimento de *X. campestris*.

O consumo de fosfato tem sido citado em vários trabalhos, demonstrando a importância deste substrato na produção de goma xantana. Um modelo fenomenológico para verificar a influência dos substratos (carbono, nitrogênio e fosfato) na biomassa e produção de goma xantana, foi proposto por LETISSE *et al.* (2003), onde verificaram que após um tempo de fermentação de 24 horas houve um consumo total do fosfato inorgânico,

neste mesmo tempo começou ocorrer consumo de sais de nitrato, que até então não estavam sendo consumidos.

Nas Tabelas 11, 12, 13 e 14 apresenta-se a matriz do planejamento fatorial 2^2 com triplicata do ponto central e as respostas produção e produtividade de goma xantana. Verifica-se que a maior produtividade ($0,36\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi obtida em meio de soro de queijo mussarela na linhagem 1182, que corresponde ao planejamento 6.

Nas Figuras 8, 9 e 10 são apresentados os efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção de goma xantana.

Tabela 11– Matriz do planejamento experimental 5 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana com *Xathomonas campestris pv manihotis* 1182 e soro de queijo prato

Ensaio	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Produção (g.L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Células (g)
1	-1 (0,05)	-1 (0,5)	7,59	0,105	0,933
2	+1 (0,15)	-1 (0,5)	11,25	0,156	0,653
3	-1 (0,05)	+1 (1,5)	19,46	0,270	0,948
4	+1 (0,15)	+1 (1,5)	18,60	0,258	0,861
5	0 (0,1)	0 (1,0)	19,12	0,266	0,986
6	0 (0,1)	0 (1,0)	19,36	0,269	0,746
7	0 (0,1)	0 (1,0)	15,47	0,215	0,780

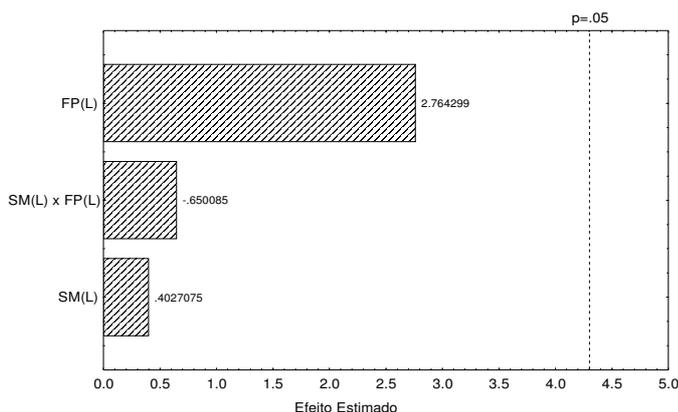


Figura 8 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana. **Onde:** FP - fosfato de potássio e SM - sulfato de magnésio.

Tabela 12 – Matriz do planejamento experimental 6 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana. *Xathomonas campestris* pv *manihotis* 1182 com soro de queijo mussarela

Ensaio	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Produção (g. L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Células (g)
1	-1 (0,05)	-1 (0,5)	12,85	0,178	0,936
2	+1 (0,15)	-1 (0,5)	9,42	0,131	0,712
3	-1 (0,05)	+1 (1,5)	25,90	0,360	1,149
4	+1 (0,15)	+1 (1,5)	21,59	0,300	0,732
5	0 (0,1)	0 (1,0)	11,44	0,159	1,163
6	0 (0,1)	0 (1,0)	17,23	0,239	0,857
7	0 (0,1)	0 (1,0)	16,24	0,226	0,877

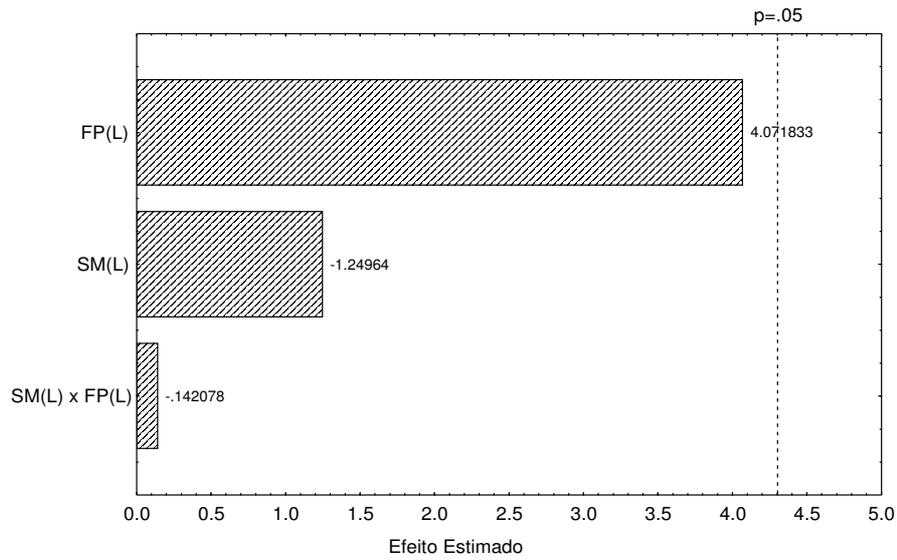


Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana. **Onde:** FP - fosfato de potássio e SM - sulfato de magnésio.

Tabela 13 – Matriz do planejamento experimental 7 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana. *Xathomonas campestris* pv *mangiferae* índice 1230 com soro de queijo prato

Ensaio	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Produção (g.L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Células (g)
1	-1 (0,05)	-1 (0,5)	6,45	0,090	0,370
2	+1 (0,15)	-1 (0,5)	6,16	0,086	0,676
3	-1 (0,05)	+1 (1,5)	16,94	0,235	0,820
4	+1 (0,15)	+1 (1,5)	16,87	0,234	0,842
5	0 (0,1)	0 (1,0)	13,36	0,186	0,617
6	0 (0,1)	0 (1,0)	21,03	0,292	0,376
7	0 (0,1)	0 (1,0)	13,85	0,192	0,558

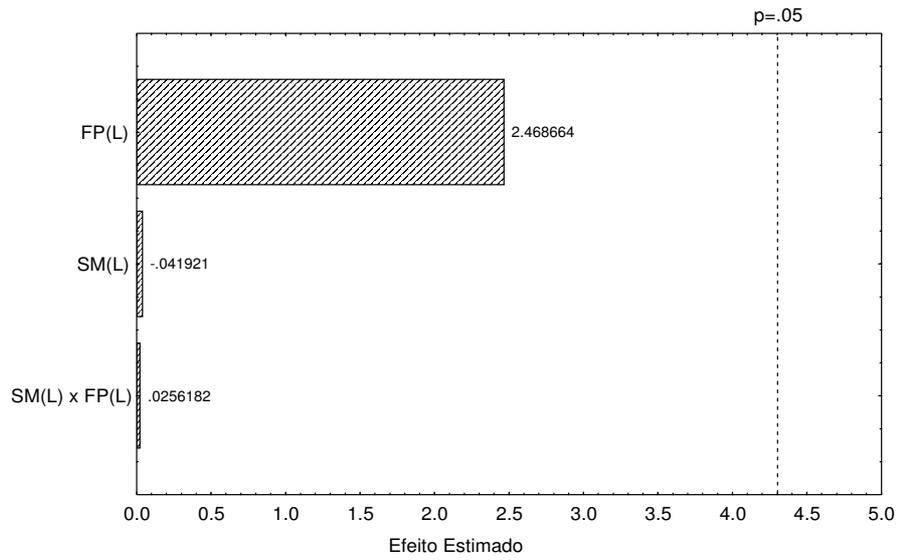


Figura 10 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre a produção da goma xantana **Onde:** FP - fosfato de potássio e SM - sulfato de magnésio.

Tabela 14 – Matriz do planejamento experimental 8 (valores codificados e reais) com respostas de concentração de massa celular, produção e produtividade de goma xantana. *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* 1230 com soro de queijo mussarela.

Ensaio	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Produção (g.L ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Células (g)
1	-1 (0,05)	-1 (0,5)	7,31	0,102	1,006
2	+1 (0,15)	-1 (0,5)	10,56	0,147	0,791
3	-1 (0,05)	+1 (1,5)	19,08	0,265	0,512
4	+1 (0,15)	+1 (1,5)	18,12	0,252	0,571
5	0 (0,1)	0 (1,0)	12,64	0,176	0,611
6	0 (0,1)	0 (1,0)	14,64	0,203	0,748
7	0 (0,1)	0 (1,0)	12,91	0,179	0,491

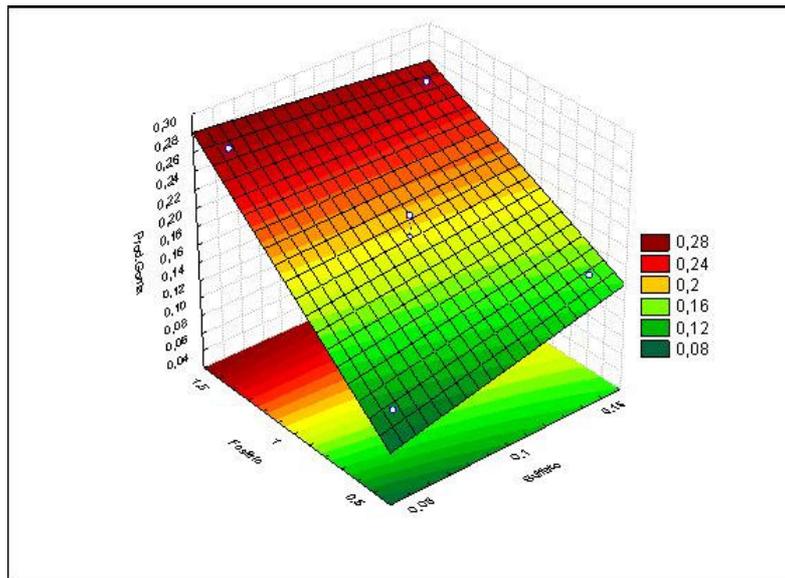


Figura 11– Superfície de resposta com as produtividades de goma em relação as variáveis fosfato de potássio e sulfato de magnésio.

Podemos observar nas Tabelas 11, 12, e 14 que as maiores produtividades, ocorreram no ensaio 3 onde havia maior quantidade de fosfato de potássio. Com base nestes resultados, efetuou-se novo estudo da produção onde foi aumentada a quantidade de fosfato de potássio para 2%, visto que este substrato tem efeito positivo na produção de goma xantana, e assim verificar se ainda ocorreriam aumentos na produção, mantendo-se a quantidade de soro de queijo em 80ml e de sulfato de magnésio em 0,1%, visto que o sulfato de magnésio não possuía efeito significativo na produção.

Pelos resultados obtidos verificou-se que mesmo aumentando-se os níveis de fosfato de potássio, não ocorreram aumentos significativos na produção de goma xantana, em relação aos planejamentos anteriores, por isso, essa condição foi escolhida como sendo a condição maximizada. Com a escolha da condição maximizada foram realizadas doze produções para cada linhagem e para cada tipo de soro de queijo, com o objetivo de obter-se quantidade de goma para análises posteriores. A média dos resultados são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultado de produtividade e produção média dos ensaios realizados com 80ml de soro de queijo; 2% de fosfato de potássio e 0,1% de sulfato de magnésio.

Ensaio	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Produção (g.L ⁻¹)	Desvio padrão
Soro de Prato 1230	0,338 ^a	24,34 ^b	0,070
Soro de Prato 1182	0,338 ^a	24,34 ^b	0,018
Soro de Mussarela 1230	0,353 ^a	25,42 ^b	0,045
Soro de Mussarela 1182	0,366 ^a	26,35 ^b	0,065

* Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Foi aplicado Teste de Tuckey para verificar diferenças significativas entre os dois tipos de soro de queijo e as duas linhagens estudadas. Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p < 0,05$), indicando que os dois soros de queijo e as duas linhagens estudadas produzem goma xantana em quantidade semelhante.

A produção de goma xantana, obtida neste trabalho a 28°C, agitação 180 rpm e meio contendo soro de queijo bruto adicionado de fosfato de potássio e sulfato de magnésio, com um tempo de fermentação de 72 horas, mostrou-se superior a produção obtida por NITSCHKE, *et al.* (2001), nas mesmas condições, que foi de 14,7 g/Kg, quando utilizaram meio de soro de leite integral 4% (soro de leite em pó) adicionando 0,01% de sulfato de magnésio e 0,5% de fosfato de potássio. Porém, as linhagens de *X. campestris* utilizadas foram diferentes nos dois trabalhos descritos.

Sabe-se que diferentes linhagens de *X. campestris* podem produzir goma xantana com diferentes composições, viscosidade e rendimento. Por esse motivo salienta-se a importância de pesquisas de novas linhagens que possam produzir goma xantana em meio de soro de queijo com alto rendimento e de boa qualidade.

Meio de soro de queijo também foi utilizado por FIALHO *et al.*, (1999) quando trabalhou na produção de gelana, obtendo 7,9 g.L⁻¹ do polissacarídeo. Utilizaram meio de soro de queijo diluído 1:4 com água e verificaram que ao aumentar a diluição do soro de queijo ocorreram diminuições na produção de gelana.

Muitos trabalhos estão sendo feitos na produção de polissacarídeos com a utilização de rejeitos industriais, entre eles podemos citar a produção de goma xantana em água residual do moinho de azeitona, onde foi obtida uma produção de 7 g.L⁻¹ de goma utilizando-

se 20% do rejeito (LÓPEZ, *et al.*, 2001); em meio contendo melaço, chegando a uma produção de 53 g.L⁻¹ (KALOGIANNIS, *et al.*, 2003) e 38,16 g.L⁻¹ de goma xantana (MAYESKI, 2005); BERWANGER, (2005), trabalhando com *Sphingomonas capsulata* em meio de melaço bruto, obteve uma produtividade de 0,19 g.L⁻¹.h⁻¹ (13,68 g.L⁻¹) de polissacarídeo. Esses resultados confirmam o que foi descrito por MOREIRA, *et al.*, (2001), que os rendimentos de goma xantana dependem da composição do meio e da linhagem da bactéria *X. campestris* utilizada.

Os valores de produção de goma xantana obtidos pelas linhagens *X. campestris* pv *manihotis* 1182 e *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 em meio de soro de queijo mussarela foram 26,35 g.L⁻¹ e 25,42 g.L⁻¹ respectivamente. Esses valores foram superiores aos obtidos por ROTTAVA (2005), que utilizou as mesmas cepas, mas em meio sintético MPI+II, no qual obteve 7,97 g.L⁻¹ e 8,83g.L⁻¹ com *X. campestris* pv *manihotis* 1182 e *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 respectivamente.

Resultados superiores aos encontrados neste estudo foram obtidos por MAYESKI, (2005) que obteve uma produção de 30,27 g.L⁻¹ trabalhando com meio sintético e goma xantana sintetizada pela *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230.

Os valores obtidos neste trabalho também foram superiores aos de MOREIRA *et al.*, (2001) que trabalharam com 18 linhagens diferentes de *X. campestris*, e encontraram rendimentos que variaram de 2,3 a 8,3 g.L⁻¹ utilizando meio PMII após 72 horas de fermentação, 28°C e 200rpm.

ESGALHADO *et al.*, (1995) trabalharam com *X. campestris* NRRL B-1459 nas seguintes condições: temperatura entre 25 e 30°C e pH entre 7,0 e 8,0 com meio contendo extrato de malte, extrato de levedura, peptona e acrescido de sais e obtiveram produção máxima de goma xantana de 18 g.L⁻¹. Os valores de goma xantana obtidos neste trabalho foram superiores (Tabela 15).

A velocidade de agitação utilizada neste estudo foi de 180 rpm, obtendo-se com isso produções média de 25 g.L⁻¹, ficando superior a produção encontrada por PAPAGIANNI *et al.*, (2001) que chegaram a um máximo de produção média de 7 g.L⁻¹ de goma xantana em meio LBG. Esse valor foi obtido após 72 horas de incubação com velocidade de agitação de 600 rpm trabalhando em fermentador. Verificaram que com a diminuição da velocidade de agitação ocorrem diminuições na produção de goma xantana. BERWANGER, (2005) observou que níveis maiores de agitação na obtenção de polissacarídeos sintetizados por *Sphingomonas capsulata* acarretavam maiores produtividades, chegando a um limite de 208 rpm.

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

O tempo de fermentação, neste estudo foi fixado em 72 horas, e agitação em 180rpm sendo que a produção de goma xantana caracterizou-se por ser superior a encontrada por PAPAGIANNI *et al.*, (2001) e PADILHA, (2003). Indicando que poderia aumentar ainda mais a produção se fossem avaliados os aumentos na velocidade de agitação e no tempo de incubação.

As figuras 12, 13, 14 e 15 apresentam o aspecto da goma xantana precipitada com etanol, sintetizadas a partir dos meios de produção e linhagens estudadas após 72 horas de fermentação.



Figura 12 - Aspecto da goma xantana precipitada, sintetizada a partir de *X. campestris* pv *manihotis* 1182 com soro de queijo mussarela, após 72 horas de fermentação.



Figura 13 – Aspecto da goma xantana precipitada, sintetizada a partir de *X. campestris* pv *manihotis* 1182 com soro de queijo prato, após 72 horas de fermentação.

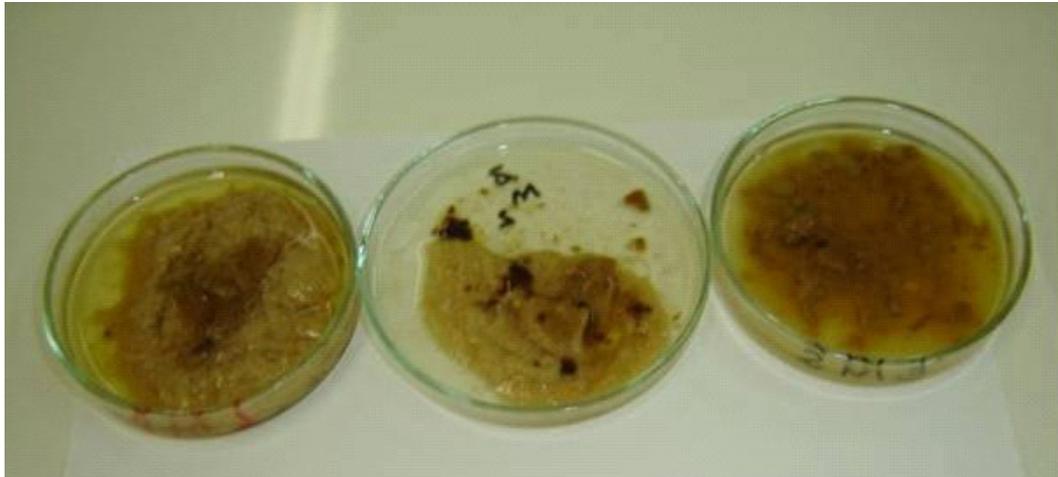


Figura 14 - Aspecto da goma xantana precipitada, sintetizada a partir de *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 com soro de queijo mussarela, após 72 horas de fermentação.



Figura 15 – Aspecto da goma xantana sintetizada a partir de *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 com soro de queijo prato, após 72 horas de fermentação.

Nas figuras 12, 13, 14 e 15 pode-se observar que não existem diferenças quanto ao aspecto visual da goma precipitada tanto com soro de mussarela como com soro de prato, assim como com as duas linhagens estudadas.

Quanto à coloração, visualmente, não foi verificada diferenças entre as gomas sintetizadas, nos dois tipos de soro de queijo e nas linhagens estudadas, mas verificou-se uma pigmentação mais escura quando comparadas as mesmas linhagens com meio sintético estudadas por ROTTAVA, (2005).

Essa coloração mais escura pode limitar a aplicação da goma produzida para alguns produtos, porém, considerando-se que o percentual de uso necessário, para conferir ao produto final, características espessantes é baixo, isso poderia deixar de ser um problema.

4.5 Consumo de Lactose

Estudos do consumo de lactose foram feitos durante a fermentação, num tempo de 72 horas retirando-se amostras a cada 12 horas, em cada um dos meios e linhagens estudadas.

Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 – Valores do consumo de lactose obtidos no meio de fermentação para os dois tipos de soro de queijo e as duas linhagens estudadas, medidas a cada 12 horas, num total de 72 horas.

Tempo (h)	Soro prato/ 1230 (g.L ⁻¹)	Soro mussarela/ 1230 (g.L ⁻¹)	Soro prato/ 1182 (g.L ⁻¹)	Soro mussarela/ 1182 (g.L ⁻¹)
0	10	9,8	9,5	9,3
12	9,7	8,9	8,7	8,5
24	9,4	8,6	7,9	8,3
36	7,8	7,5	7,5	7,4
48	6,9	7,0	6,4	7,2
60	6,4	6,8	6,6	6,5
72	5,5	5,0	5,1	5,6

Pode-se verificar na Tabela 16, que ocorreu consumo de lactose no decorrer da fermentação, evidenciando que *X.campestris* é capaz de utilizar este carboidrato como fonte de carbono para produção de goma xantana.

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

4.6 pH do Meio de Fermentação

Estudos do pH foram feitos durante a fermentação, num tempo de 96 horas retirando-se amostras a cada 12 horas, em cada um dos meios e linhagens estudadas.

Os resultados de pH do meio de fermentação são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 – Valores de pH obtidos no meio de fermentação para os dois tipos de soro de queijo e as duas linhagens estudadas, medidas a cada 12 horas, num total de 96 horas.

Tempo de fermentação	Mussarela 1182	Mussarela 1230	Prato 1230	Prato 1182
0	7,16	7,19	7,20	7,17
12	6,90	6,86	7,13	7,10
24	6,78	6,76	6,99	6,89
36	6,99	6,70	6,92	6,92
48	7,01	6,65	7,13	7,23
60	7,07	6,66	7,03	6,75
72	6,79	6,66	6,88	6,83
84	7,00	6,73	7,15	7,17
96	6,99	6,70	7,21	7,32

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

Neste estudo, verifica-se que os valores de pH mantiveram-se entre 7,32 e 6,65, não ocorrendo valores próximos de pH 5,0 ao longo da fermentação. PAPAGIANNI, *et al.* (2001) também não obtiveram decréscimos nos valores de pH durante o período de fermentação, ao contrário, ocorreram aumentos chegando a um valor máximo de pH 9,5 quando utilizaram 600 rpm. Neste trabalho os maiores valores de pH ficaram entre 7,21 e 7,32 ficando bem abaixo do mencionado anteriormente.

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

A produção de goma xantana é influenciada pelo pH, sendo que ESGALHADO *et al.*, (1995) encontraram um máximo de produtividade de goma com as melhores viscosidades em valores de pH próximos a neutralidade.

Os valores de pH durante a produção de goma xantana por *X. campestris*, podem diminuir ou aumentar durante a fermentação, dependendo das condições e composição do meio (PAPAGIANNI, *et al.*, 2001). Neste trabalho ocorreram pequenas diminuições no pH chegando a um mínimo de pH 6,70, permanecendo basicamente em pH neutro.

A adição de K_2HPO_4 no meio de fermentação influencia nos valores de pH, reduzindo as flutuações do pH da cultura (KALOGIANNIS *et al.*, 2003). Isto ocorreu nos quatro experimentos realizados, onde pode-se observar que os valores de pH permaneceram próximos ao neutro (Tabela 17).

4.7 Reologia

4.7.1 Viscosidade aparente do caldo de fermentação

Com o objetivo de verificar o comportamento da viscosidade do meio de fermentação foram realizadas análises de viscosidade aparente do meio durante 72 horas, retirando-se amostras a cada 12 horas. Os resultados podem ser vistos nas Tabelas 18, 19, 20 e 21.

Tabela 18 – Viscosidade aparente a 25°C, $191,4s^{-1}$, para o caldo de fermentação antes e após a retirada das células, meio contendo soro de queijo mussarela com *X. campestris* pv *manihotis* 1182, durante 72 horas de fermentação.

Tempo (h)	Viscosidade do meio (m.Pa.s)	
	Com células	Sem células
0	2,6270	-----*
12	2,5044	2,1605
24	2,4225	2,6587
36	2,4638	2,1559
48	2,4110	2,3075
60	2,4478	2,1720
72	2,4983	2,2028

* abaixo do limite de torque do equipamento

Tabela 19 – Viscosidade aparente a 25°C, 191,4s⁻¹, para meio de fermentação antes e após a retirada das células, meio contendo soro de queijo mussarela com *X. campestris* pv *mangefaraeindicae* 1230, durante 72 horas de fermentação.

Tempo (h)	Viscosidade do meio (cp)	
	Com células	Sem células
0	-----*	-----*
12	2,1375	1,9920
24	2,2731	1,9490
36	2,1030	1,9076
48	2,1742	1,9053
60	2,0655	1,8525
72	2,1099	1,9054

* abaixo do limite de torque do equipamento

Tabela 20 – Viscosidade aparente a 25°C, 191,4s⁻¹, para meio de fermentação antes e após a retirada das células, meio contendo soro de queijo prato com *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230, durante 72 horas de fermentação.

Tempo (h)	Viscosidade do meio (cp)	
	Com células	Sem células
0	-----*	-----*
12	2,0698	2,0823
24	2,0862	2,1015
36	2,0961	2,1375
48	2,0938	2,1788
60	2,2340	2,1306
72	2,1720	2,1106

* abaixo do limite de torque do equipamento

Tabela 21 – Viscosidade aparente a 25°C, 191,4s⁻¹, para meio de fermentação antes e após a retirada das células, meio contendo soro de queijo prato com *X. campestris* pv *manihotis* 1182, durante 96 horas de fermentação.

Tempo (h)	Viscosidade do meio (cp)	
	Com células	Sem células
0	2,1789	2,0340
12	2,1467	2,0220
24	2,1099	2,0249
36	2,1536	2,3190
48	2,9672	2,7925
60	2,1582	2,2271
72	2,0892	2,1012

Analisando os resultados obtidos verificou-se que a viscosidade do caldo de fermentação não aumentou durante o decorrer do tempo de fermentação.

Isto também foi observado por FIALHO, *et al.* (1999) quando trabalharam com soro de queijo bruto na produção de gelana. Esses autores verificaram que isto poderia ter acontecido porque o soro bruto inclui íons metálicos ou outros componentes em concentrações que inibem a produção de biopolímeros sem efeitos drásticos no crescimento celular. Em soro diluído ocorreram níveis máximos de polissacarídeos em 72 h de fermentação, que foram acompanhados pelo aumento da viscosidade do caldo sendo que após esse tempo ocorreram decréscimos na viscosidade do caldo.

Viscosidade do caldo de fermentação pode ser usada como indicador da produção de goma xantana, entretanto não refletem a qualidade do polímero produzido. Alta viscosidade do caldo pode ser decorrente da alta concentração de polímeros com baixa qualidade. (ANTUNES *et al.*, 2000^(b)).

4.7.2 Viscosidade aparente das soluções aquosas de goma

As propriedades reológicas foram avaliadas através da análise de viscosidade aparente, para verificar a qualidade das gomas produzidas, demonstrando o comportamento

das soluções aquosas e salinas 3% do polímero na temperatura de 25°C. Na Tabela 22 são mostrados os resultados das médias da viscosidade aparente das soluções aquosas de gomas produzidas com os dois tipos de soro de queijo e as duas linhagens de *X.campestris* estudadas e desvios padrões para estas leituras.

A viscosidade aparente das gomas produzidas foi tratada estatisticamente através do teste de Tukey, onde comparou-se leituras a 25°C, taxa de cisalhamento de 13,2s⁻¹, para gomas sintetizadas com soro de queijo prato, soro de queijo mussarela, linhagem 1230 e linhagem 1182, verificando que não ocorreram diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Tabela 22 – Viscosidade aparente a 25°C, 13,2s⁻¹, para soluções aquosas a 3% de gomas sintetizadas com duas linhagens de *Xanthomonas campestris* e dois tipos de soro de queijo, com 72h de fermentação.

Planejamento	Viscosidade aparente média (m.Pa.s ou cP)	desvio padrão
Soro de mussarela 1182	57,3878 ^a	7,962
Soro de prato 1182	55,2882 ^a	11,63
Soro de mussarela 1230	61,3536 ^a	10,79
Soro de prato 1230	55,0882 ^a	12,03

* Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,5)

Os resultados encontrados neste trabalho nas condições de 3% de goma; 10rpm a 25°C, ficaram bem abaixo dos encontrados por ANTUNES *et al.*, (2000) quando trabalharam com meio de soro de queijo com soluções aquosas de goma 3%; 12rpm a 25°C, obtendo uma viscosidade entre 10.000 e 15.000cP.

NITSCHKE *et al.*, (2001), determinaram viscosidade aparente com solução aquosa 1% de goma sintetizada em meio de soro de queijo em viscosímetro Brookfield tipo cone/plate spindle CP-52, 0,6rpm à 25°C e observaram que o meio de soro de queijo integral apresentou viscosidade final de 9508cP, ficando acima da viscosidade encontrada neste trabalho que foi de 61,35cP em soro de queijo mussarela na linhagem 1230.

Uma maior viscosidade aparente sugere que a goma produzida apresenta maior qualidade (NITSCHKE *et al.*, 2001), o que não ocorreu neste trabalho, pois encontrou-se

valores baixos para viscosidade aparente, quando comparado aos valores citados pela literatura.

FIALHO *et al.*, (1999) verificaram que a goma gelana sintetizada com soro de queijo obteve viscosidades mais elevadas do que as gomas sintetizadas em meio com glicose, o que não ocorreu neste caso, pois ROTTAVA, (2005) trabalhando em meio sintético com as linhagens 1230 e 1182 em solução aquosa 3% de goma xantana com viscosímetro Brookfield modelo LVDV III, spindle 18, a 25°C com taxa de cisalhamento de 1,32s⁻¹ obteve valores de viscosidade de 1818cP e 925cP para as linhagens 1230 e 1182 respectivamente, ficando, portanto acima dos valores de viscosidade encontrados com soro de queijo (Tabela 22).

ROTTAVA, (2005), verificou que a solução aquosa de goma proveniente do microrganismo 1230 apresentou melhor viscosidade, o que não ocorreu neste trabalho, pois não houve diferenças significativas de viscosidade entre as duas linhagens empregadas.

ANTUNES *et al.*, (2000^(a)), verificaram que goma xantana produzida em meios convencionais MPI e MP11 por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 06 obtiveram viscosidades comparáveis à goma xantana comercial, com resultados superiores a 20.000cP a 6 rpm em solução aquosa 3% de goma. Quando empregados os meios alternativos (soro de queijo), os resultados de viscosidade foram mais baixos, indicando que em meios convencionais produziu xantana com qualidade superior às gomas sintetizadas com meios alternativos, o que também ocorreu neste trabalho quando comparado ao trabalho de ROTTAVA, (2005) que obteve viscosidades maiores em meio convencional com as mesmas linhagens estudadas.

Valores de viscosidade aparente devem ser comparados quando ocorrem nas mesmas condições, o que nem sempre é possível pois diferentes equipamentos são utilizados para a realização desta análise, por isso cita-se abaixo alguns autores que trabalharam com viscosidade aparente de goma xantana, porém em condições diferentes das citadas neste trabalho impossibilitando deste modo a comparação de valores.

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

MOREIRA *et al.*, (2001) também verificaram relações da viscosidade com a temperatura, das seguintes formas: não ocorre nenhuma variação; ocorre decréscimo da

viscosidade com o aumento da temperatura ou ocorre decréscimo da viscosidade com o decréscimo da temperatura. A viscosidade aparente de soluções aquosas 3% foram medidas a 25°C e 12 rpm, chegando a um valor máximo em torno de 15.000 cP, ficando acima do encontrado neste trabalho que foi de 61,35cP.

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

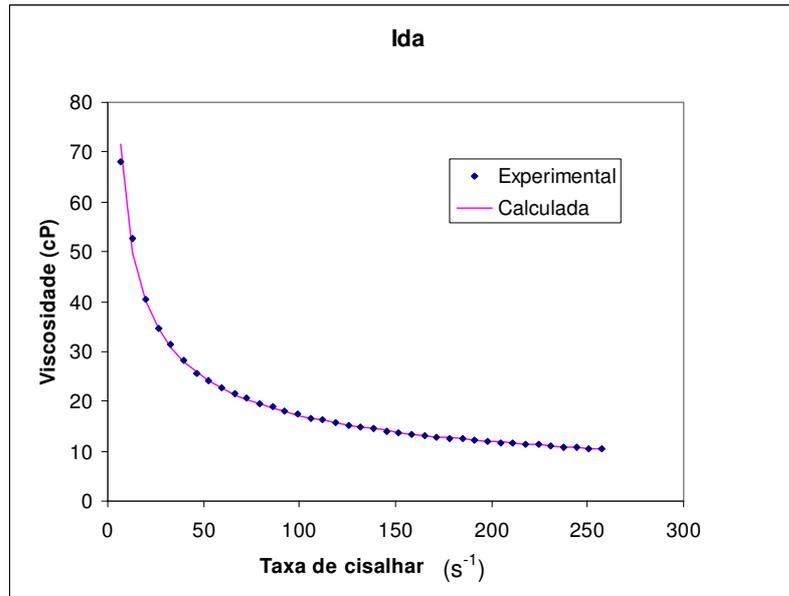
O efeito da concentração de goma no comportamento viscoso das gomas xantana, guar e goma locusta foram observados por YASEEN *et al.*, (2005), que também verificaram dependência da temperatura na viscosidade das soluções de gomas.

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

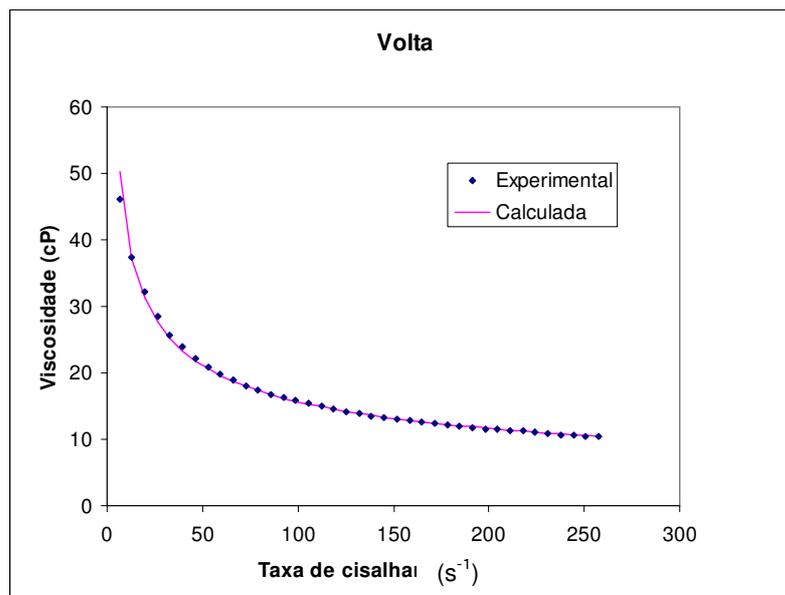
LÓPEZ *et al.*, (2004) observaram que com o aumento da temperatura ocorreu um decréscimo na viscosidade das gomas estudadas, sendo mais marcante para goma comercial do que para goma sintetizada em meio de rejeitos agroindustriais.

Outro fator que interfere nos valores de viscosidade aparente é a condição de preparo da amostra, que possibilita o arranjo conformacional das cadeias (BRESOLIN *et al.*, 1998)

Para confirmação do comportamento pseudoplástico das soluções das gomas produzidas a partir de 72 horas de fermentação, com os dois diferentes meios de soro e as duas linhagens estudadas, foi realizado o ajuste do modelo de Ostwald-de Waele aos dados experimentais, a partir da regressão linear. Foi obtida a viscosidade calculada ($\log \gamma \times \log$) que foi comparada com a viscosidade experimental. Estes resultados são apresentados nas Figuras 16, 17, 18 e 19. Junto às legendas de cada uma das figuras são apresentados os R^2 e os valores de K e n.



(a)



(b)

Figura 16- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de soro de queijo Mussarela e *Xanthomonas campestris pv. manihotis*, 72h de fermentação, leituras a 25°C, ida(a) e volta(b). Ida ($R^2 = 0,9992$, $K = 1,926$, $n = 0,475$) e volta ($R^2 = 0,9988$, $K = 1,126$, $n = 0,572$).

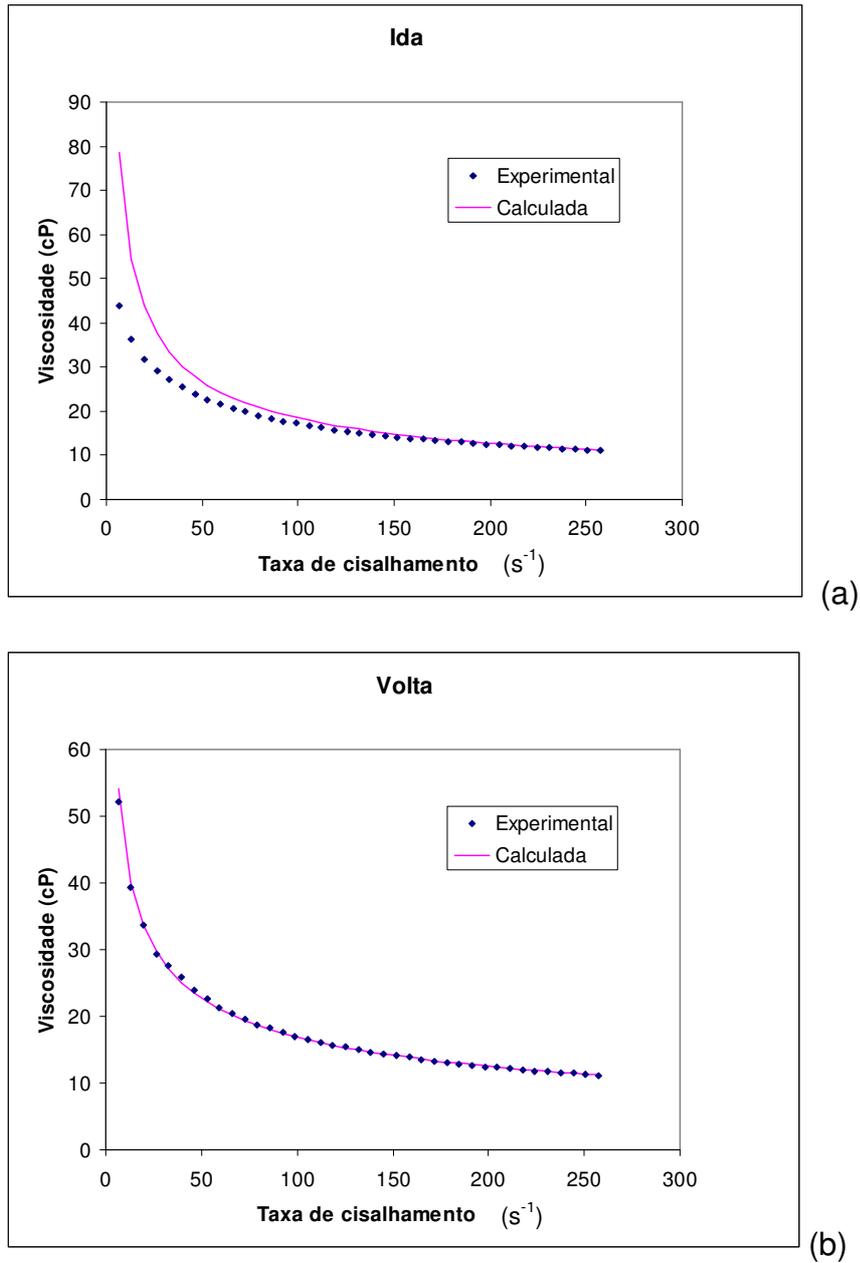


Figura 17 - Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de soro de queijo Prato e *Xanthomonas campestris pv. manihotis*, 72h de fermentação, leituras a 25°C, ida(a) e volta(b). Ida ($R^2 = 0,9970$, $K = 2,149$, $n = 0,467$) e volta ($R^2 = 0,9994$, $K = 1,218$, $n = 0,571$).

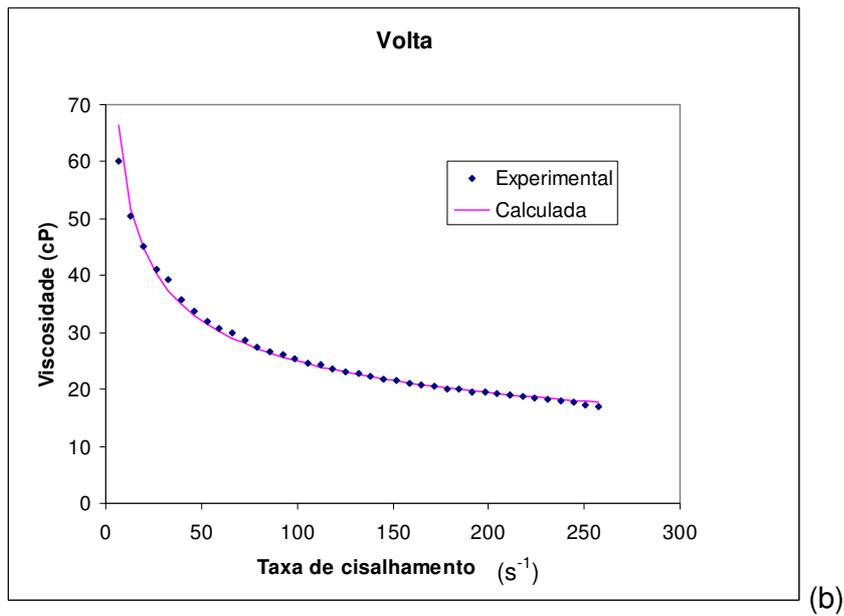
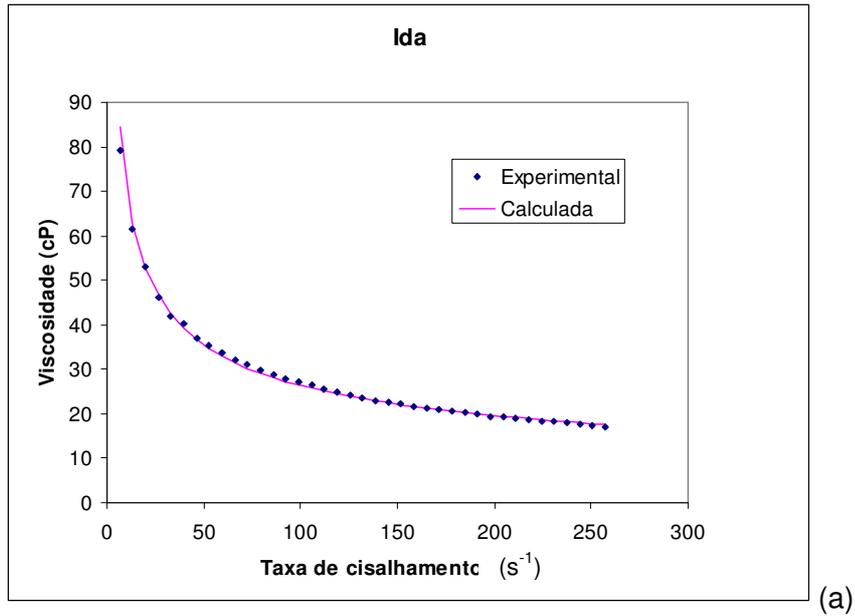


Figura 18 - Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de soro de queijo Mussarela e *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, 72h de fermentação, leituras a 25°C, ida(a) e volta(b). Ida ($R^2 = 0,9985$, $K = 1,898$, $n = 0,571$) e volta ($R^2 = 0,9980$, $K = 1,314$, $n = 0,640$).

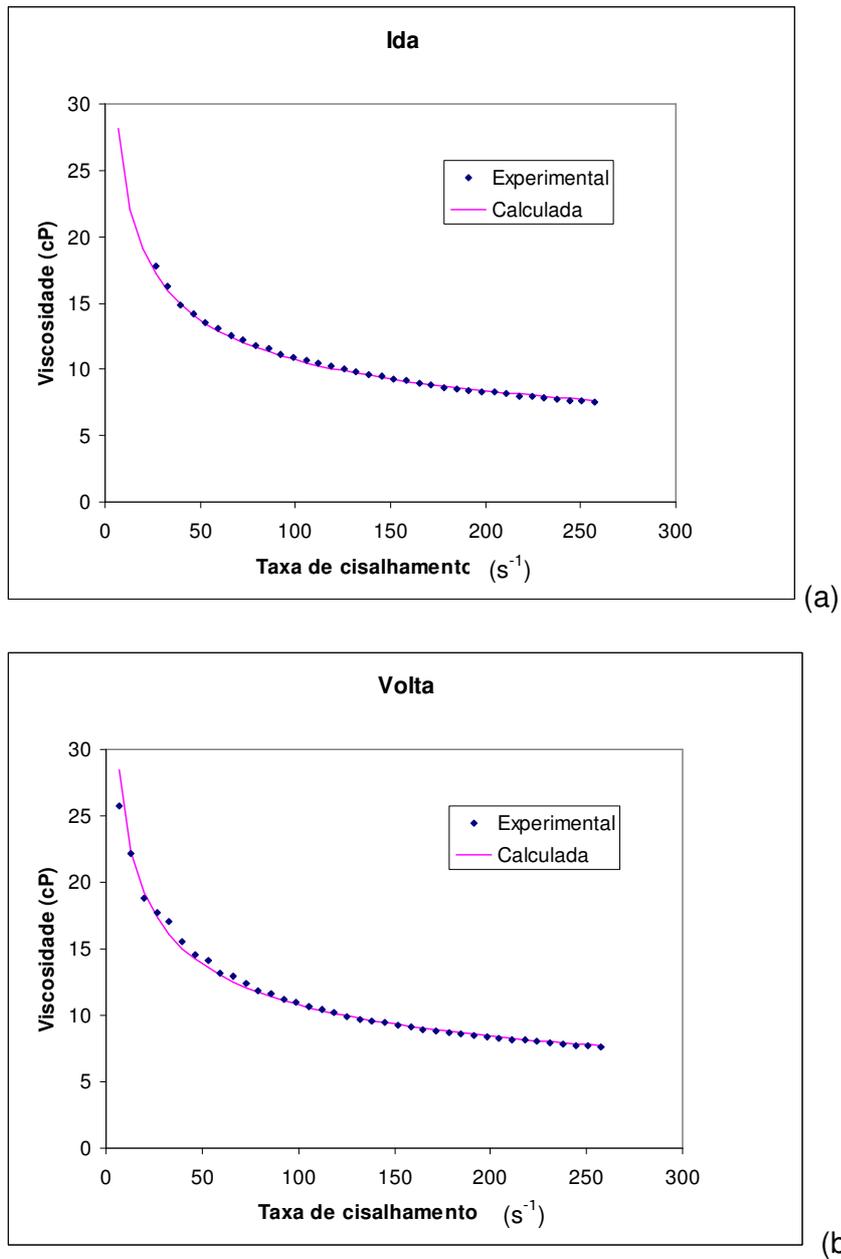


Figura 19 - Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de soro de queijo Prato e *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, 72h de fermentação, leituras a 25°C, ida(a) e volta(b) Ida ($R^2 = 0,9988$, $K = 0,550$, $n = 0,645$) e volta ($R^2 = 0,9981$, $K = 0,560$, $n = 0,643$).

O comportamento pseudoplástico (a viscosidade diminui conforme aumenta a taxa de cisalhamento) foi verificado em todas as amostras como pode-se verificar nas figuras 16, 17, 18 e 19. Comportamento pseudoplástico é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos (CACIK et al., 2001; RAO et al., 2003).

NITSCHKE, et al., (2001) verificaram a influência da taxa de cisalhamento na viscosidade do polímero observando um comportamento pseudoplástico, ou seja, diminuição da viscosidade à medida que aumenta a taxa de cisalhamento.

O comportamento pseudoplástico tem sido observado por vários autores, MOREIRA et al., (2001) selecionando linhagens de *X. campestris*; KAYACIER & DOGAN (2005), quando estudaram as propriedades reológicas de algumas soluções de misturas de gomas-salep; entre outros.

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

YASEEN et al., (2005) estudaram as propriedades reológicas de soluções de gomas selecionadas e verificaram que a goma arábica, pectina, celulose microcristalina e metilcelulose exibiram comportamento Newtoniano, sendo que as demais gomas estudadas incluindo goma xantana exibiram comportamento pseudoplástico à taxa de cisalhamento maior que 10s⁻¹.

Goma xantana quando adicionada a alimentos fluídos, aumenta a viscosidade a baixa taxa de cisalhamento enquanto tem pouco efeito na viscosidade de alimentos a altas taxas de cisalhamento. Este comportamento dá várias vantagens: com a diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, o produto torna-se fácil para escoar, misturar ou bombear, as propriedades organolépticas dos produtos alimentícios são também favoravelmente afetadas. (SPEERS & TUNG, 1986 apud KIM & YOO, 2005)

4.7.3 Viscosidade aparente das soluções salinas de goma

Foram avaliadas as viscosidades aparentes das soluções aquosas de goma a 3% sintetizadas pelas linhagens e pelos soros de queijo estudados, com adição de sais a 0,1% como cloreto de sódio; cloreto de cálcio e cloreto de potássio.

As medidas de viscosidade foram às mesmas utilizadas para soluções aquosas de goma a 3%, ou seja, spindle 18 a 25°C com taxa de cisalhamento de 13,2s⁻¹. Os resultados podem ser vistos na Tabela 23.

Tabela 23 – Viscosidade aparente a 25°C, 13,2s⁻¹, para soluções de gomas a 3% adicionadas de 0,1% de sais, sintetizadas com duas linhagens de *Xanthomonas campestris* e dois tipos de soro de queijo, com 72h de fermentação.

Planejamento	NaCl (m.Pa.s)	CaCl ₂ (m.Pa.s)	KCl (m.Pa.s)
Soro de Mussarela 1182	165,76	115,12	266,64
Soro de Prato 1182	87,43	106,02	246,54
Soro de Mussarela 1230	83,68	131,87	116,47
Soro de Prato 1230	123,67	113,67	271,44

Verifica-se na Tabela 23 que os valores de viscosidade aparente em soluções salinas 0,1% aumentaram em relação à viscosidade aparente de soluções aquosas 3% de goma (Tabela 22). Estes resultados discordam dos encontrados por PADILHA, 2003 onde obteve uma diminuição da viscosidade aparente das soluções quando adicionadas de sais de sódio e potássio, mas concordam em relação à adição de cálcio, já que também obteve um incremento da viscosidade aparente das soluções analisadas.

BERWANGER (2005), verificou que as soluções salinas apresentaram viscosidades aparentes menores do que as soluções aquosas de goma a 3%, discordando deste trabalho, já que a viscosidade foi maior em soluções salinas de goma.

ROCKS (1971) relatou que soluções contendo 0,5% de xantana aumentaram a viscosidade com a adição de traços de sais. Entretanto, em baixas concentrações de goma xantana a adição de traços de sais causou diminuição na viscosidade. Este comportamento também foi verificado por SMITH & PACE (1982), que atribuíram este efeito à redução das dimensões moleculares resultando na diminuição das forças eletrostáticas.

Foi observado por LÓPEZ, *et al.* (2004) que um aumento da concentração de sais leva a um decréscimo da viscosidade de soluções de goma xantana. Esse decréscimo foi mais acentuado na presença de cátions divalentes ($MgCl_2$).

4.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Com o objetivo de caracterizar os monossacarídeos presentes nas gomas sintetizadas neste estudo e também na goma comercial, realizou-se análise de cromatografia líquida de alta eficiência.

A composição química da goma xantana é fundamental para sua funcionalidade e aplicação. As gomas de interesse comercial devem ser capazes de formar estruturas secundárias, terciárias e, às vezes, quaternárias em meio aquoso. Por esse motivo à estrutura primária (ou química) não pode constituir-se num impedimento espacial. A goma xantana é capaz de formar estas estruturas (MORRIS, 1984).

O cromatograma da goma comercial é mostrado na Figura 20.

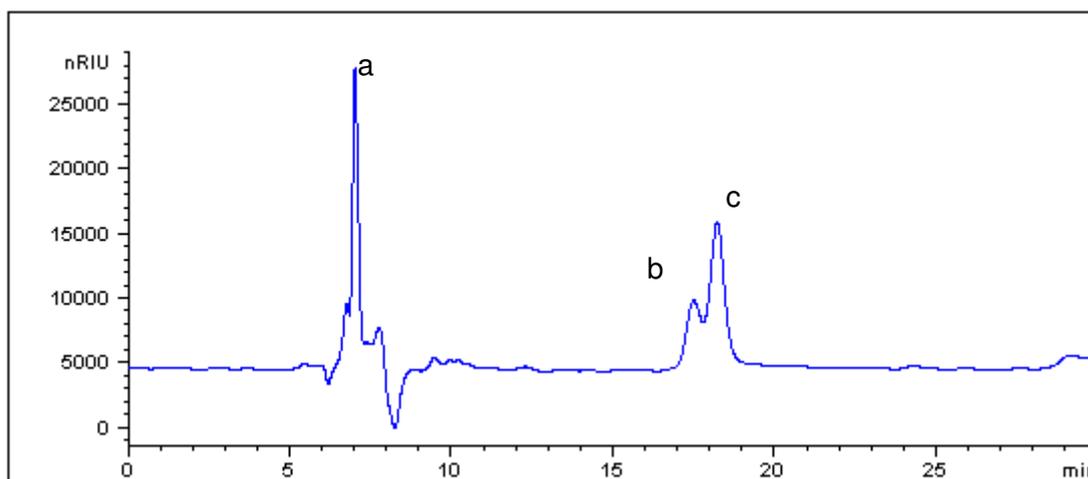


Figura 20 Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH_2 , para separação de açúcares da goma comercial, com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) manose; (c) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.

De acordo com a Figura 20 a goma comercial apresenta em sua constituição apenas manose e glicose. Isto está de acordo com a literatura, já que xantana comercial não apresenta ramnose na sua composição (MCNELLY & KANG, 1997)

As Figuras 21, 22, 23 e 24 mostram os cromatogramas das quatro gomas sintetizadas neste trabalho.

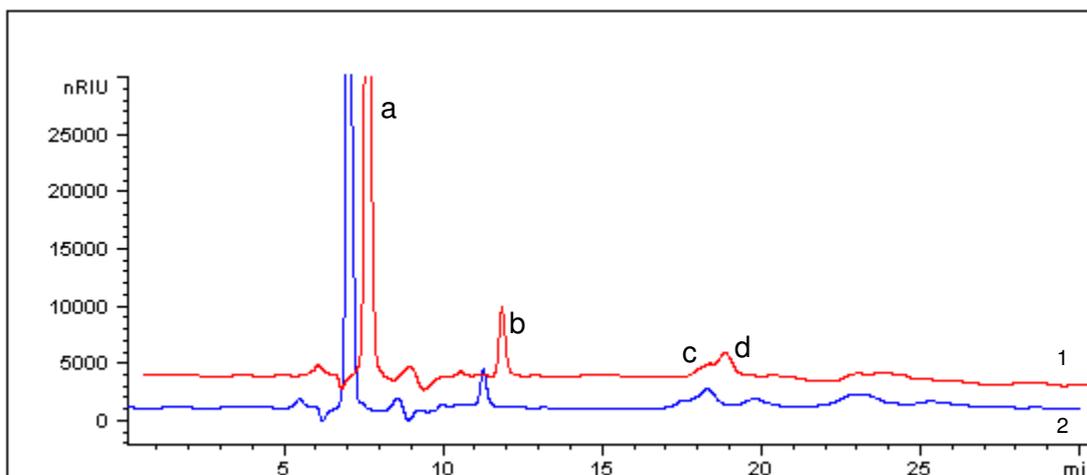


Figura 21- Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH_2 , para separação de açúcares da goma sintetizada com *X. campestris* pv *manihotis* 1182 em soro de queijo mussarela (2) e *X. campestris* pv *manihotis* 1182 em soro de queijo prato (1), com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) ? (c) manose; (d) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.

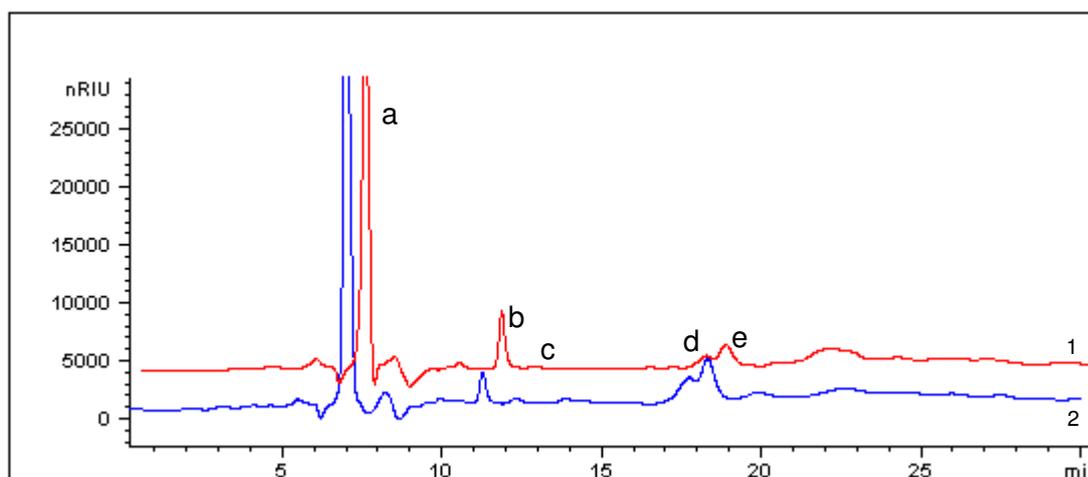


Figura 22- Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH_2 , para separação de açúcares da goma sintetizada com *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 em soro de queijo mussarela (2) e *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 em soro de queijo prato (1), com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) ? (c) ramnose (d) manose; (e) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.

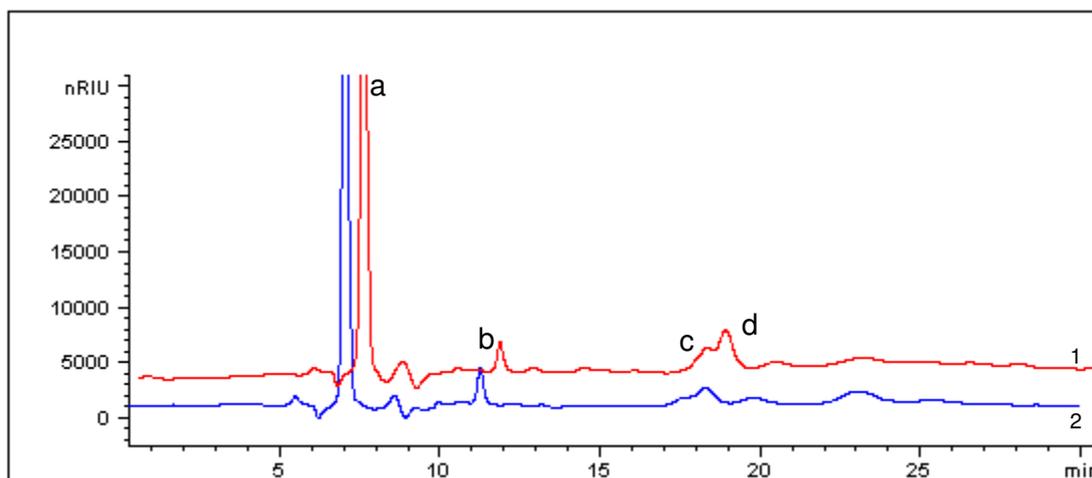


Figura 23- Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH_2 , para separação de açúcares da goma sintetizada com *X. campestris* pv *manihotis* 1182 em soro de queijo mussarela (2) e *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 em soro de queijo mussarela (1), com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) ? (c) manose; (d) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.

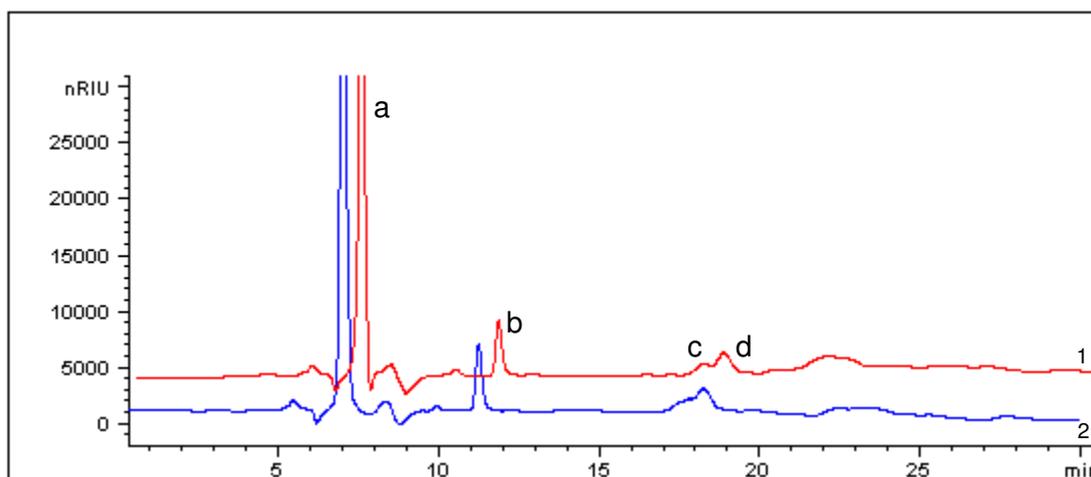


Figura 24- Cromatograma obtido por CLAE usando coluna NH_2 , para separação de açúcares da goma sintetizada com *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 em soro de queijo prato (2) e *X. campestris* pv *manihotis* 1182 em soro de queijo prato (1), com fase móvel de acetonitrila:água (75:25), 0,5ml/min a 25°C. (a) solvente; (b) ? (c) manose; (d) glicose. Amostra foi hidrolizada com TFA 0,1M/ 100°C/ 16 horas.

Observando as Figuras 21, 22, 23 e 24 verifica-se que todas as gomas sintetizadas apresentaram em comum em sua estrutura glicose e manose. Segundo PADILHA, (2003), esta composição é a mais comumente encontrada na goma xantana, pois em seu trabalho,

realizou análises através de CLAE e verificou que a goma xantana produzida pelas linhagens 289 e CA110 apresentaram a mesma composição de monossacarídeos.

Este resultado também foi encontrado por MOREIRA *et al.* (1998, 2001), que encontraram apenas os monossacarídeos glicose e manose na estrutura da goma xantana, sendo que ramnose, galactose e fucose também foram investigadas.

MOREIRA *et al.* (1998) estudaram a composição química das gomas xantana, gelana e clairana e verificaram que glicose e ácido glucurônico foram encontrados na amostras das três gomas estudadas, sendo que ainda foram encontradas manose na goma xantana; fucose e galactose na goma clairana e ramnose na amostra de gelana.

Glicose e ácido glucurônico foram detectadas por VENDRUSCULO *et al.*, (2000), nas amostras de goma xantana com 72 e 96 horas de fermentação, porém manose apenas foi detectada nas gomas sintetizadas com 96 horas de fermentação, o que difere deste trabalho pois manose foi detectada em todas as amostras de goma xantana sintetizadas em 72 horas de fermentação.

Nas gomas sintetizadas por *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 foram detectados sinais que foram identificados como sendo ramnose, utilizando um padrão externo (Figura 22), o qual não foi detectado nas amostras de gomas sintetizadas por *X. campestris* pv *manihotis* 1182 (Figura 21).

A presença de outros monossacarídeos, como galactose e ramnose, embora incomum, tem sido reportada (SUTHERLAND, 1993; MOREIRA *et al.*, 2001).

ANTUNES *et al.*, (2000^a) encontraram linhagens de *Xanthomonas*, principalmente patovar *pruni* que sintetizam goma xantana com a ramnose, além da glicose e manose.

Ramnose também foi encontrada no trabalho realizado por VENDRUSCULO *et al.*, (2000) nas amostras de goma xantana sintetizadas pela *X. campestris* pv *pruni* com 72 e 96 horas de fermentação, diferenciando-se da goma comercial que não possuía ramnose em sua estrutura.

A presença de ramnose na composição da goma é uma característica desejável, já que os polímeros dos quais faz parte possuem capacidade de formar géis verdadeiros. (MCNELLY & KANG, 1977).

Através dos cromatogramas (letra b) pode-se verificar também a presença de um açúcar eluído em 11 minutos, que não foi identificado, sendo que foram testados os

seguintes açúcares: ramnose, galactose, lactose. Com base nestes resultados verificou-se a necessidade de analisar novos padrões de açúcares para elucidar este pico.

Na Tabela 24 pode-se verificar a equação da reta e R^2 que foram obtidos através das curvas de padrões externos dos monossacarídeos glicose, manose e ramnose.

Tabela 24 – Equação da reta e R^2 obtidos para as diferentes curvas de calibração dos padrões de açúcar.

Monossacarídeos	Equação da Reta	R^2
Glicose	$Y = 2,5103 \times 10^8 x - 2,9602 \times 10^3$	0,970
Manose	$Y = 1,0759 \times 10^8 x - 7,9141 \times 10^2$	0,972
Ramnose	$Y = 2,4306 \times 10^8 x - 1,8333 \times 10^5$	0,835

Na Tabela 25 verifica-se os tempos de retenção (T_r) e a concentração dos açúcares obtidos através de CLAE para a goma comercial e para as amostras de goma xantana sintetizados a partir das duas linhagens estudadas e dos dois tipos de soro empregados como meio de fermentação.

Tabela 25 - Tempo de retenção (Tr) em minutos e concentração dos açúcares (g/ml) da goma comercial e das gomas sintetizadas com *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 e pv *manihotis* 1182 com soro de queijo prato e mussarela.

Amostras/açúcares	?	Glicose		Manose		Ramnose	
	Tr	Tr	Concen.	Tr	Concen.	Tr	Concen.
Goma comercial	-	18,205	0,00275	17,479	0,00363	-	-
1230; soro de queijo prato	11,245	18,262	0,00063	17,655	0,00085	12,291	0,00105
1230; soro de queijo mussarela	11,251	18,293	0,00080	17,733	0,00156	12,298	0,00110
1182; soro de queijo prato	11,220	18,233	0,00065	17,768	0,00086	-	-
1182; soro de queijo mussarela	11,230	18,263	0,00052	17,554	0,00071	-	-

Através da Tabela 25 podemos observar que ocorreu diferença de composição entre as gomas sintetizadas pelas duas linhagens, através da presença de ramnose na linhagem 1230, em concentração maior que a glicose e a manose.

Este comportamento também foi salientado por SUTHERLAND, (1993) que afirmou que diferentes linhagens de *Xanthomonas* e condições de cultivo produzem polímeros com diferentes composições.

Fatores genéticos do microrganismo utilizado são as causas das mudanças qualitativas observadas nas gomas, porém outros fatores como condições nutricionais e operacionais (concentração do inóculo, meio, aeração, agitação, temperatura, pH e tempo de cultivo) são as causas das mudanças quantitativas que podem ocorrer nas gomas sintetizadas (MORRIS, 1984; GARCIA-OCHOA *et al*, 2000; SUTHERLAND, 1993).

Podem ocorrer ainda mutações na cepa bacteriana capazes de mudar a proporção entre os monossacarídeos glicose e manose ou fazerem surgir outros açúcares (MORRIS, 1984).

5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1 CONCLUSÕES

- É possível produzir goma xantana com *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* e *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* em meio de soro de queijo prato e mussarela, na condição maximizada que foi de 28°C, 180rpm, 72h de fermentação em meio contendo soro de queijo; 0,1% de MgSO₄.7H₂O e 2% de K₂HPO₄.
- Não ocorreram diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,5), quanto à produtividade de goma xantana nas duas linhagens estudadas e nem nos dois tipos de soro de queijo.
- Não ocorreram diferenças na caracterização dos dois tipos de soro de queijo utilizados (prato e mussarela), sendo, portanto possível à utilização dos dois tipos de soro para a produção de goma xantana com as linhagens 1230 e 1182.
- A goma xantana produzida apresentou comportamento reológico pseudoplástico característico de soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos.
- Não ocorreram diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,5) nos valores de viscosidade aparente das soluções de goma 3% produzidas tanto com a linhagem 1230 como com a 1182 assim como com os dois tipos de soro estudadas.
- A viscosidade aparente foi medida em spindle 18, com temperatura de 25°C com taxa de cisalhamento 13,2s⁻¹ em soluções de goma 3%, obtendo-se valores variando de 55 a 61 m.Pa.s.
- Ocorreram aumentos nos valores de viscosidade aparente quando 0,1% de sais foram adicionados às soluções de goma 3%. Em média um aumento de 200% foi observado quando adicionou-se 0,1% de NaCl ou CaCl₂, e 467% quando adicionou-se 0,1% de KCl.
- Na caracterização de monossacarídeos, através de CLAE, das gomas sintetizadas foram encontradas glicose e manose em todas as amostras. Ramnose foi encontrada nas gomas sintetizadas por *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 nos dois tipos de soro.
- Foi detectado ainda um sinal de monossacarídeo iluído em 11 minutos, o qual não foi identificado, assim devem ser testados novos padrões.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar outras linhagens para verificar a produtividade e viscosidade aparente em meio com soro de queijo
- Fazer tratamento no soro de queijo com a finalidade de retirar interferentes que possam prejudicar a quantidade e qualidade da goma sintetizada, assim como com o objetivo de clarificação deste obtendo-se gomas sem pigmentação amarelada.
- Avaliar níveis de hidrólise da lactose com o objetivo de verificar se as linhagens estudadas produzirão goma com maior rendimento.
- Caracterizar a estrutura dos ácidos da goma produzida através de técnicas cromatográficas.
- Analisar a viscoelasticidade das soluções aquosas da goma.
- Fazer desacetilação da goma para verificar os efeitos na viscosidade aparente.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físico e químicas de bebidas lácteas. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v 21, p.187-192. 2001
- ANDRADE, R.L.P de; MARTINS, J.F.P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas L.*) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, 22:3, 2002.
- (a) ANTUNES, A.E.C.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Síntese de Biopolímeros xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6 nº12. p.123-125. 2000.
- (b) ANTUNES, A.E.C.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris pv pruni*. **Ciência e Engenharia**, v.9 nº 1, p. 83-87. 2000.
- BANIK, R.M.; KANARI, B.; UPADHYAY, S.N. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16. p.407-414. 2000
- BERWANGER, A. L. da S. **Produção e caracterização de biopolímeros sintetizados por *Sphingomonas capsulata***. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões campus de Erechim. 2005.
- BREZOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules** v.23, pp.263-275. 1998.
- BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. **Introdução a Química de Alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 1992.
- BOZA, Yolanda E. A. G. **Encapsulamento *Beijerinckia sp* utilizando spray-drier**. Departamento de Ciência de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2002

CACIK, F.; DONDO, R.G.; MARQUÉS, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. **Computers and Chemical Engineering** v.25, p. 409-418, 2001.

CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1003-1014, 1978

CHI, Z. & ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.206-211, 2003

CASAS, J.A.; SANTOS, V.E.; GARCIA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.282-291, 2000

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC** . Edgar Blucher, SP - 179p. 1998. cidade

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

CNPGL – Centro Nacional de Pesquisa em Gado Leiteiro – EMBRAPA: MG. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/>>. Acesso em jan.2006.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6ªed. Editora da UNICAMP - Campinas SP. 1995.

COTTRELL I.W.; KANG, K.S. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. **Developments in Industrial Microbiology**. v.19. p.117-131, 1978.

DUDMAN, W.F. The extracellular Polysaccharides of *Rhizobium japonicum*: Composition Studies. **Carbohydrate Research**, v.46, p.97-110, 1976.

DRUZIAN, J. I. **Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.)** Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2000

ESGALHADO, M.E.; ROSEIRO, J.C.; AMARAL COLLAÇO, M.T. Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*. **Process Biochemistry**. V. 30. nº 7. p.667-671. 1995.

FARRO, A.P.C.; VIOTTO, L. A. Redução do teor de gordura do soro de queijo pré-tratado por ultrafiltração. **4º Congresso ibero-americano em ciência e tecnologia de membranas**. Florianópolis. CITEM. 2003.

FIALHO, A.M.; MARTINS, L.O.; DONVAL, M.L.; LEITÃO, J.H.; RIDOUT, M.J.; JAY, A.J.; MORRIS, V.J.; SÁ-CORREIA, I. Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65 nº6, p.2485-2491. 1999

FRANCO, G. **Nutrição – Texto básico e tabela de composição química dos alimentos**. 6ª edição. Editora Atheneu, 227p. 1982.

GALINDO, E. Aspects of the process for xanthan production. **Institution of Chemical Engineers**, v.72, part. C, p.227-237, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; GRACIA-LEON, M.A.; ROMERO, R. Kinetic modelling of xanthan production from sucrose. **Chemical Biochemistry Engineering** v.4, p.15-20. 1990.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v.18, p.549-579, 2000.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCON, A. Structured kinetic model for *Xanthomonas campestris* growth. **Enzyme and Microbial Technology**. v.34, p.583-594. 2004.

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

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**, v.2, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001

HOLT, J.G.; KRIEQ, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. – **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. Philadelphia (USA): Lippinott Williams & wilkins. 9 ediação, 100-174p. 1994.

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

JEANNES, A. R.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUTSON, C. A. *Polysaccharide of Xanthomonas campestris NRRL B - 1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis*. ARS-NC-51. Washington, D. C., **Agriculture Research Service**, U. S. Departmente of Agriculture, 1976

JEANNES, A.; PITTSLEY, J.E.; SENTI, F.R. Polysaccharide B-1459. A new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. *Journal Applied Polymer Science*. v.5 p.519-526, 1961

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

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

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

LANARA – Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II-Métodos Físico e Químicos- **Ministério da Agricultura- Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária** – Laboratório Nacional de Referência Animal. Brasília, 1981.

LETISSE, F.; LINDLEY, N. D. & ROUX, G. Development of modeling approach for prediction of growth and xanthan gum production using *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Progress**, v.19, p.822-827, 2003

LEWIS. M.J. **Propiedades Físicas de los Alimentos y los Sistemas de Processado**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1993

LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. **Elsevier Science Ltd Wat. Res**. v.35, n. 7, p.1828-1830, Great Britain, 2001

- LÓPEZ.M.J.; VARGAS-GARCÍA, M.C.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; MORENO,J. Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates. **Journal of Food Engineering** v.63. p.111-115. 2004.
- MARCOTTE, M. HOSHAHILI, A.R.T.; RAMASWAMY, H.S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**. v.34, p.695-703. 2001
- MAUGERI, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 3, p.125-150. 2001
- MAURY, A; & ROQUE, J. Lês Polysaccharides. **Biofutur**, p. 17-31, Sep. 1986
- MAYESKI, E.; Produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* utilizando resíduo industrial. Monografia de graduação. Curso de Biologia URI - campus de Erechim, 2005.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinatiom of reducing sugar. **Ana. Chemistry**, v.31. p.426-428, 1959.
- MORAINE, R.A.; ROGOVIN, P. Kinetics of the Xanthan Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol. XV, p.225-237. 1973
- MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C.T. Determinação da composição de biopolímeros por cromatografica em camada delgada: metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 4, nº3, p.222-224.1998
- MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; GIL-TURNES,C.; VENDRUSCULO, C.T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Food Hydrocolloids**. v.15, p.469-474. 2001
- MOREIRA, Angelita da S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. Tese de Doutorado – Programa de Doutorado em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, 2002.

MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, nº2, p.300-305, 2003

MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. Ed. **Gums and stabilisers for the food industry**. Oxford: Pergamon Press, p. 57-78, 1984

MORRIS, E. R. Rheology of xanthan: suspension of particles and stabilization of emulsions. **Food & Ingredients Journal of Japan**, v.167, p.31-36, 1996.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C7L. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v.21 nº1, p.82-85, 2001.

PACE, Garyw. Polímeros microbianos. In : BU'LOOCK, John ; KRISTIANSEN, Bjorn. **Biotecnología Básica**. Traducción : Paloma Liras Padín. Zaragoza : Acribia, 1991. p. 449-462.

PADILHA, F.F. **Produção de Biopolímeros por Microorganismos Modificados Geneticamente**. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2003.

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

PASQUEL, Antonio. Gomas: utilização e aspectos reológicos. **Boletim SBCTA**, v.33, nº1, p.86-97, 1999.

PINTO, E.P., **Desacetilação de Xantana: influência no comportamento reológico**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, 2005.

POPLAWSKI, A. R.; URBAN, S. C.; CHUN, W. Biological role of Xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Applied and Environmental Microbiology** v.66, nº12, p.5123-5127, 2000.

- PORTILHO, M. **Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por duas linhagens de *Agrobacterium* sp**, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, UNICAMP, 2002. 86p
- RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURAIHKUMAR, G. K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, v.38, p.1301-1310, 2003.
- ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões campus de Erechim. 79p. 2005.
- SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. – Estudo da produção de B-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v.24, nº4, 2004.
- SCHWARTZ, R.D.; BODIE, E.A. Production of high-viscosity whey-glucose broths by a *X. campestris* strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 51, nº1 p.203-205. 1986.
- SERPA, L. **Concentração de proteínas de soro de queijo por evaporação a vácuo e ultrafiltração**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões campus de Erechim. 2005. p
- SILVA F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters** v.203, p.165-71, 2001.
- SMITH, J. H.; PACE, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.32, p.119-129, 1982.
- SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv. *Pruni* cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**. V. 8, n. 2, p. 115-123, 2000.
- SOUW, P.; DEMAÏN, A.L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology** v.37, nº6 p.1186-1192. 1979

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

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

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

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Guaíba: UFSM. 144pp. 1997.

VENDRUSCULO, C.T.; MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; ZAMBIAZI, R. SCAMPARINI, A.R.P. Heteropolysaccharides produced by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* C24. In: **Nishinari, K. Ed. Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, p. 187-191. 2000.

XUEWU Z.; XIN L.; DEXIANG, G.; WEI, Z.; TONG, X. YONGHONG, M. Rheological Models for Xanthan Gum. **Journal of Food Engineering**. v.27. p.203-209. 1996

YASEEN, E.I.; HERALD, T.J.; ARAMOUNI, F.M.; ALAVI, S. Rheological properties of selected gum solutions. **Food Research Internacional** v.38, p.111-119. 2005.

WEI, Y; FANG, J. Studies on the chromatographic behaviour of some uronic acid and neutral sugars on an amino-bonded phase column. **Journal of Chromatography**, v.513, p.227-235, 1990.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)