



ANDRÉA POLICASTRO CANUTO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE GOMA
XANTANA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE
RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

Curitiba

2006

ANDRÉA POLICASTRO CANUTO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE GOMA
XANTANA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE
RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
pelo Programa de Pós-Graduação em
Processos Biotecnológicos da Universidade
Federal do Paraná

Orientador: Prof^a Dr^a Adenise L. Woiciechowski
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Curitiba

2006

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais João Celso e Nelide,
por todo apoio e incentivo,
dedico este trabalho.
A vocês, todo meu amor.*

A Deus, por me acompanhar neste caminho.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a. Adenise L. Woiciechowski, por sua orientação e acompanhamento durante a execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, pelo voto de confiança, incentivo e oportunidade de trabalhar na área de Bioprocessos e Biotecnologia Industrial, agradeço também as contribuições científicas que tiveram fundamental importância durante o desenvolvimento das pesquisas.

À Professora Dr^a. Luciana P. S. Vandenberghe, agradeço pela recepção acolhedora nesta Instituição e pelo valioso auxílio técnico e científico prestado durante o andamento deste trabalho.

Aos meus queridos pais João Celso e Nelide, pelo constante apoio, incentivo e presença ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Processos Biotecnológicos, Fernanda, Gustavo, Mariana, Giselle e Cristine pela amizade, risos e apoio ao trabalho, que com certeza tornaram o ambiente de trabalho muito mais agradável.

À Mitiyo, pelo apoio técnico e auxílio prestado durante os trabalhos realizados e à Michele pelo auxílio com a estatística deste trabalho, muito obrigada.

À CAPES pelo suporte financeiro concedido durante o período de Mestrado.

À UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos pela infra-estrutura que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus acima de tudo, por ter me concedido o dom da vida e por ter me dado o privilégio de concretizar esta vitória.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

*“Quatro etapas para uma façanha:
planejar objetivamente, preparar religiosamente,
proceder positivamente, perseguir persistentemente”*

William A. Ward

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
2.1 Objetivos gerais.....	03
2.2 Objetivos específicos.....	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
3.1 Exopolissacarídeos Microbianos.....	04
3.2 <i>Xanthomonas campestris</i>.....	06
3.3 A Goma Xantana.....	07
3.3.1 A estrutura da goma xantana.....	08
3.4 Produção.....	11
3.5 Propriedades da Goma xantana.....	14
3.5.1 Propriedades reológicas da Goma Xantana.....	14
3.6 Aplicações da Goma Xantana.....	15
3.6.1 Usos na Indústria Alimentícia.....	16
3.6.2 Usos na Indústria Farmacêutica.....	18
3.6.3 Usos na Indústria de Cosméticos.....	18
3.6.5 Aplicações Industriais.....	19
3.7 A Importância do Inóculo em Processos Fermentativos.....	20
3.7.1 O Inóculo na produção da goma xantana.....	21
3.8 Fermentação no Estado Sólido (FES).....	22
3.8.1 Definição e características gerais da FES.....	22
3.8.2 Aplicações da FES.....	24
3.9 Utilização de Resíduos Agroindustriais Nacionais.....	26
3.9.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar	27
3.9.2 Caldo de Cana.....	28
3.9.3 Bagaço de Mandioca.....	29

3.9.4 Polpa Cítrica.....	31
3.9.5 Soro de Queijo.....	32
3.9.6 Água de Maceração do Milho.....	33
3.9.7 Farelo de Soja.....	34
3.9.8 Melaço de Soja.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Microrganismos.....	37
4.2 Conservação das Cepas.....	37
4.3 Preparo do Inoculo.....	38
4.4 Substratos.....	39
4.4.1 Preparo do Bagaço de Cana-de-Açúcar.....	40
4.4.1.2 Determinação da Umidade no Bagaço de Cana-de-Açúcar.....	40
4.4.2 Preparo do Farelo de Soja.....	40
4.4.2.1 Determinação da Umidade no Farelo de Soja.....	41
4.4.3 Preparo do Bagaço de Mandioca.....	41
4.4.3.1 Determinação da Umidade no Bagaço de Mandioca.....	41
4.4.3.2 Hidrólise ácida do Bagaço de Mandioca.....	41
4.4.4 Preparo da Polpa Cítrica.....	42
4.4.4.1 Determinação da Umidade na Polpa Cítrica.....	42
4.4.4.2 Hidrólise ácida da Polpa Cítrica.....	43
4.4.5 Preparo do Melaço de Soja.....	43
4.4.6 Preparo do Soro de Queijo.....	44
4.4.7 Preparo do Caldo de Cana-de-Açúcar.....	44
4.4.8 Preparo da Água de Maceração do Milho.....	44
4.5 Caracterização Físico-Química dos substratos: Hidrolisado de Bagaço de Mandioca, Hidrolisado de Polpa Cítrica, Melaço de Soja, Soro de Queijo, Caldo de Cana e Água de Maceração do Milho (Milhocina®).....	45
4.5.1 pH.....	45
4.5.2 Açúcar Redutor.....	45
4.6 As Fermentações.....	45
4.6.1 ESTUDO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	46
4.6.1.1 Teste para a Seleção de Cepa	46
4.6.2 ESTUDO EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES).....	47

4.6.2.1 FES utilizando o Bagaço de Cana como suporte e variando soluções impregnantes usadas como substrato.....	47
4.6.2.2 FES utilizando combinações de substratos.....	48
4.6.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA FES.....	49
4.6.3.1 Influência da proporção entre Farelo de Soja / Bagaço de Cana e taxa de inóculo.....	49
4.6.3.2 Influência da proporção entre Bagaço de Mandioca / Bagaço de Cana e taxa de inóculo.....	50
4.6.4 Estudo Cinético do Tempo de Produção da goma xantana por FES usando Bagaço de Mandioca e Bagaço de Cana.....	51
4.6.5 Estudo com diferentes umidades nas condições otimizadas para FES em frascos.....	52
4.6.6 Teste em colunas de Raimbault para FES.....	52
4.7 Análises Realizadas nos Fermentados.....	53
4.7.1 ANÁLISES REALIZADAS NOS FERMENTADOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	53
4.7.1.1 Biomassa.....	53
4.7.1.2 Goma Xantana.....	54
4.7.2 ANÁLISES REALIZADAS NOS FERMENTADOS OBTIDOS POR FES.....	54
4.7.2.1 Recuperação da Goma Xantana.....	54
4.7.2.2 Quantificação da goma xantana produzida.....	54
4.7.2.3 pH.....	55
4.7.2.4 Umidade.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Análises Físico-químicas realizadas nos Hidrolisados de Bagaço de Mandioca, Polpa Cítrica e nos subprodutos e resíduos Melaço de Soja, Soro de Queijo, Caldo de Cana e Água de Maceração do Milho (Milhocina®).....	56
5.1.1 Açúcar Redutor e pH.....	56
5.2 Teste para Seleção de Cepa por Fermentação Submersa.....	57
5.3 ESTUDO EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES).....	59
5.3.1 FES utilizando o Bagaço de Cana como suporte e variando soluções impregnantes usadas como substrato.....	59

5.3.2 FES utilizando combinações de substratos.....	62
5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA FES.....	63
5.4.1 Influência da proporção entre Farelo de Soja / Bagaço de Cana e taxa de inóculo na produção de goma xantana por FES.....	63
5.4.2 Influência da proporção entre Bagaço de Mandioca / Bagaço de Cana e taxa de inóculo na produção de goma xantana por FES.....	67
5.5 Estudo Cinético do Tempo de Produção da goma xantana por FES.....	70
5.6 Estudo com diferentes umidades em condições otimizadas para FES.....	72
5.7 Teste em colunas de Raimbault para FES.....	72
6. CONCLUSÃO.....	74
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- A BACTÉRIA <i>Xanthomonas campestris</i>	07
FIGURA 2	- ESTRUTURA BÁSICA PROPOSTA PARA A GOMA XANTANA.....	09
FIGURA 3	- BIOSÍNTESE DO EXOPOLISSACARÍDEO GOMA XANTANA.....	12
FIGURA 4	- FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA.....	13
FIGURA 5	- RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS NA GRANULOMETRIA DE 0,8-2,0MM: BAGAÇO DE CANA, BAGAÇO DE MANDIOCA, POLPA CÍTRICA, FARELO DE SOJA.....	39
FIGURA 6	- HIDROLISADOS, RESÍDUOS E SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS UTILIZADOS: CALDO DE CANA, HIDROLISADO DE POLPA CÍTRICA, HIDROLISADO DE BAGAÇO DE MANDIOCA, MELAÇO DE SOJA, ÁGUA DE MACERAÇÃO DO MILHO (MILHOCINA®), SORO DE QUEIJO.....	39
FIGURA 7	- BAGAÇO E HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DE MANDIOCA.....	42
FIGURA 8	- POLPA CÍTRICA PELETIZADA E HIDROLISADO ÁCIDO DE POLPA CÍTRICA.....	43
FIGURA 9	- AGITADOR DE MOVIMENTO ORBITAL UTILIZADO NAS FERMENTAÇÕES SUBMERSAS.....	47
FIGURA 10	- FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM COLUNAS DE RAIMBAULT.....	53
FIGURA 11	- ASPECTO DAS COLÔNIAS DA CEPA <i>Xanthomonas campestris</i> LPB01, CRESCIDA EM ÁGAR YM, 28°C ±2 POR 48 HORAS.....	59
FIGURA 12	- GRÁFICO DA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE ART PARA O CALDO DE CANA IMPREGNADO EM BC.....	60
FIGURA 13	- GRÁFICO DA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE ART PARA O MELAÇO DE SOJA IMPREGNADO EM BC.....	60
FIGURA 14	- GRÁFICO DA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM VÁRIAS	

CONCENTRAÇÕES DE ART PARA O HIDROLISADO DE POLPA CÍTRICA IMPREGNADO EM BC.....	61
FIGURA 15 - GRÁFICO DA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE ART PARA O HIDROLISADO DE BAGAÇO DE MANDIOCA IMPREGNADO EM BC.....	61
FIGURA 16 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA % DE TAXA DE INÓCULO E DA PROPORÇÃO EM % DE FS EM RELAÇÃO AO BC.....	65
FIGURA 17 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA % DE FARELO DE SOJA E DA % DA TAXA DE INOCULAÇÃO PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	66
FIGURA 18 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA INFLUÊNCIA DA % DE TAXA DE INÓCULO E DA PROPORÇÃO EM % DE BM EM RELAÇÃO AO BC.....	68
FIGURA 19 - GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DA % DE BM E DA % DA TAXA DE INOCULAÇÃO PARA O MODELO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE XANTANA OBTIDA A PARTIR DE UMA VARIEDADE NORMAL E UMA SUB-VARIEDADE DE <i>X. campestris</i>	10
TABELA 2	- GRAUS DE SUBSTITUINTES ACETIL E PIRUVIL PARA VÁRIAS AMOSTRAS DE GOMA XANTANA COMERCIAL.....	10
TABELA 3	- COMPARATIVOS ENTRE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO E FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	24
TABELA 4	- APLICAÇÕES DA FES EM DIFERENTES SETORES ECONÔMICOS.....	25
TABELA 5	- COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	28
TABELA 6	- COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DE MANDIOCA.....	30
TABELA 7	- VALORES MÉDIOS DE DETERMINAÇÕES FÍSICO- QUÍMICAS DE BAGAÇOS DE MANDIOCA ORIGINÁRIOS DE INDÚSTRIAS DE SÃO PAULO, MINAS GERAIS E PARANÁ, EXPRESSAS EM MATÉRIA SECA.....	31
TABELA 8	- COMPOSIÇÃO TÍPICA DA ÁGUA DE MACERAÇÃO DO MILHO OU “ <i>CORN STEEP LIQUOR</i> ”.....	34
TABELA 9	- ANÁLISES QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS DO MOLASSA OU MELAÇO DE SOJA DA EMPRESA IMCOPA EM DIFERENTES °BRIX.....	36
TABELA 10	- CÓDIGO DAS CEPAS DE BACTÉRIAS TESTADAS.....	37
TABELA 11	- MEIOS BÁSICOS DE CRESCIMENTO (MANUTENÇÃO DA CEPA) E DE PRODUÇÃO USADOS PARA A <i>Xanthomonas Campestris</i>	38
TABELA 12	- COMBINAÇÕES REALIZADAS COM OS SUBSTRATOS PARA A FES.....	49
TABELA 13	- INFLUÊNCIA DA TAXA DE INÓCULO E PROPORÇÕES DE FS/BC NA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	50
TABELA 14	- INFLUÊNCIA DA TAXA DE INÓCULO E PROPORÇÕES DE BM/BC NA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	51
TABELA 15	- RESULTADOS OBTIDOS NAS ANÁLISES REALIZADAS NOS SUBPRODUTOS/RESÍDUOS UTILIZADOS.....	57

TABELA 16 - PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM g/L COM AS CEPAS QUE TIVERAM PRODUÇÃO SIGNIFICATIVA EM CADA SUBSTRATO/RESÍDUO.....	57
TABELA 17 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM g/L COM AS CEPAS QUE TIVERAM PRODUÇÃO SIGNIFICATIVA EM CADA SUBSTRATO/RESÍDUO.....	58
TABELA 18 - PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA UTILIZANDO DIFERENTES COMBINAÇÕES DE SUBSTRATOS.....	62
TABELA 19 - RESULTADO DA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA OBTIDA PARA CADA ENSAIO REALIZADO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3 ² COMPLETO COM FARELO DE SOJA / BAGAÇO DE CANA.....	64
TABELA 20 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA UTILIZANDO FARELO DE SOJA.....	66
TABELA 21 - RESULTADO DA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA OBTIDA PARA CADA ENSAIO REALIZADO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3 ² COMPLETO COM BAGAÇO DE MANDIOCA / BAGAÇO DE CANA.....	67
TABELA 22 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA UTILIZANDO BAGAÇO DE MANDIOCA.....	69
TABELA 23 - EVOLUÇÃO DA CINÉTICA FINAL DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA POR FES UTILIZANDO BM 90% / BC10% E TAXA DE INÓCULO 10%.....	71
TABELA 24 - PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM DIFERENTES UMIDADES TESTADAS.....	72
TABELA 25 - PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM COLUNAS DE RAIMBAULT UTILIZANDO AERAÇÃO FORÇADA.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ART	Açúcares Redutores Totais
BC	Bagaço de Cana-de-Açúcar
BM	Bagaço de Mandioca
CCT	Centro de Culturas Tropicais
Da	daltons
EPS	exopolissacarídeo
FDA	Food and Drug Administration
FES	Fermentação no Estado Sólido
FS	Farelo de Soja
°Brix	Graus Brix
°C	graus centígrados
g	grama
g/Kg	grama por kilo
g/L	grama por litro
h	horas
HBM	Hidrolisado de Bagaço de Mandioca
HPC	Hidrolisado de Polpa Cítrica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L	litros
LPB	Laboratório de Processos Biotecnológicos
mL	mililitro
mm	milímetro
MSoja	Melaço de Soja
N	concentração normal
nm	nanômetro
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
PC	Polpa Cítrica
SQueijo	Soro de Queijo
%	porcentagem
UFPR	Universidade Federal do Paraná
(v/v)	volume/volume
X.	<i>Xanthomonas</i>

RESUMO

O presente trabalho teve por principal objetivo o desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de goma xantana por fermentação no estado sólido (FES), a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais. Cinco cepas da bactéria *Xanthomonas campestris* foram testadas qualitativamente e quantitativamente para a produção de goma xantana por fermentação submersa utilizando como substratos: hidrolisado de bagaço de mandioca, hidrolisado de polpa cítrica, melaço de soja, soro de queijo, caldo de cana e água de maceração do milho (Milhocina®) na concentração de 20 g/L de açúcar redutor total (ART). A cepa *Xanthomonas campestris* LPB01 obteve o melhor resultado (14,12 g/L de goma xantana) utilizando-se hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com extrato de levedura. Após, foram realizados estudos em FES, fixando-se o valor da umidade em torno de 85% e taxa de inoculação de 10% (v/v) em relação à fase líquida, onde se impregnou o bagaço de cana (suporte) com resíduos/subprodutos como substrato líquido em diferentes concentrações de ART. O hidrolisado de bagaço de mandioca, hidrolisado de polpa cítrica e o melaço de soja apresentaram os melhores resultados. Na etapa seguinte, os melhores substratos líquidos originados dos resíduos sólidos foram utilizados em sua forma *in natura* (sólidos) como suporte para a FES, puros e/ou combinados com o bagaço de cana na proporção 1:1, utilizando-se solução salina como solução impregnante. O farelo de soja (FS) e o bagaço de mandioca (BM) combinado com o bagaço de cana (BC) apresentaram os melhores resultados (FS / BC = 95,23 g/Kg de goma na base seca; BM / BC = 104,81 g/Kg de goma na base seca). As fermentações seguintes consistiram em testar a influência de diversas proporções entre FS / BC e taxa de inóculo e BM / BC e taxa de inóculo na produção de goma xantana por FES. O melhor resultado (218,23 g/Kg de goma na base seca) foi alcançado com 90%BM / 10%BC e taxa de inoculação de 10%. Após a definição de parâmetros físicos e químicos para o processo de produção de goma xantana, fez-se um estudo cinético com o objetivo de definir-se qual o melhor tempo para a produção do biopolímero. Este foi alcançado após 120 horas de fermentação. Posteriormente, nas condições já otimizadas, realizou-se um estudo com diferentes valores de umidade (70, 75 e 80%), que permitisse uma melhor passagem do ar pela coluna de fermentação. A umidade de 80% mostrou-se mais compatível. Realizou-se em seguida um teste para verificar a influência da aeração forçada sobre a produção da goma xantana, onde diferentes níveis de aeração foram avaliados (20, 40 e 60 mL/min). As fermentações foram conduzidas em um sistema de colunas de vidro, onde a produção atingiu 165,32 g/Kg de goma xantana na base seca com aeração de 60 mL ar/min. As condições otimizadas neste trabalho foram CB90% / SCB10% com uma taxa de 10% de inóculo, umidade de 80% em 120 horas de fermentação.

Palavras-chave: Goma xantana, FES, Fermentação submersa, *Xanthomonas campestris*.

ABSTRACT

The main objective of the present work was the development of a bioprocess for the production of xanthan gum by solid state fermentation (SSF) using wastes and agro-industrials by-products. Five strains of the bacteria *Xanthomonas campestris* were selected qualitatively and quantitatively for xanthan gum production by submerged fermentation using as substrates: cassava bagasse hydrolysate, pulp citric hydrolysate, soy molasse, cheese whey, sugar cane broth, corn steep liquor (Milhocina®) at 20 g/L of total reducing sugar (TRS). The strain LPB01 presented the best result (14.12 g/L of xanthan gum) using cassava bagasse hydrolysate supplemented with yeast extract. Therefore, LPB01 was selected for further studies using SSF. Initially, SSF was conducted with LPB01 at the following conditions, humidity at around 85% and inoculation rate of 10% (v/v) of the liquid phase. The liquid phase was obtained by soaking the cane bagasse (as support) with the liquid waste or by-products (as substrate) at different concentrations of TRS. The cassava bagasse hydrolysate, pulp citric hydrolysate and soy molasse presented the best results for xanthan gum production. In the next stage, the best liquid substrates generated from the solid waste were used in natura as support for the SSF. These liquid substrates were used pure or combined with the cane bagasse in the proportion of 1:1, using saline as impregnant solution. The soy bran (SB) and cassava bagasse (CB) combined with the sugar cane bagasse (SCB) showed the best results (SB / SCB = 95.23 g/Kg of gum at dry weight; CB / SCB = 104.81 g/Kg of gum at dry weight). The following SSF were conducted with the purpose of testing the influence of various proportions of SB / SCB and CB / SCB with several inoculum rates for the production of xanthan gum. The best production (218.23 g/Kg of gum at dry weight) was achieved with 90% CB / 10% SCB and an inoculation rate of 10%. The above results were used to set physical and chemical parameters for the next experiments. A kinetic study was carried out to define the best time for the production of the xanthan gum. It was reached after 120 hours of fermentation. Using the above optimized conditions (CB90% / SCB10% and 10% rate of inoculum) different levels of humidity (70, 75 and 80%) were tested to allow a better passage of air in the column of fermentation. It was verified that a humidity of 80% promoted a higher production of xanthan gum. Then, different levels of forced air (20, 40 and 60 mL/min) were tested with a system of glass column under the optimized conditions described above. The aeration of 60 mL/min was the best for the fermentation, but it only reached 165.32 g/Kg of xanthan gum at dry weight. Using SSF under several conditions it was possible to optimize the bioprocess for production of xanthan gum. The optimized conditions were CB90% / SCB10% and 10% rate of inoculum, humidity of 80% and 120 hours of fermentation.

Key-words: Xanthan gum, SSF, Submerged Fermentation, *Xanthomonas campestris*.

1. INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos (EPS) microbianos fazem parte de uma classe de biopolímeros hidrossolúveis produzidos por um grande número de microrganismos. Devido a grande diversidade de suas propriedades e estruturas, estes EPS têm um grande número de aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica entre outras, devido a suas propriedades como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes, texturizantes e gelificantes (SUTHERLAND, 1990).

A produção de biopolímeros microbianos ou EPS apresenta-se como uma alternativa às gomas de origem vegetal, por possuírem propriedades físico-químicas de elevado interesse industrial e que são essenciais para definir sua aplicação final (PACE, 1991).

O exopolissacarídeo (EPS) goma xantana é tradicionalmente produzido por fermentação submersa. A produção deste polissacarídeo por fermentação submersa é freqüentemente acompanhada por um substancial aumento na viscosidade do meio de fermentação, prejudicando assim a distribuição de ar no meio de cultura. Sob essas condições, a disponibilidade do oxigênio pode vir a ser um fator limitante para o metabolismo celular, afetando a síntese do polissacarídeo (WERNAU, 1985; PETER *et al.*, 1989). Por causa desta alta viscosidade no meio, os custos de produção são muito mais onerosos já que a agitação de um meio mais viscoso requer muito mais energia gerando desgaste do equipamento, quando comparado a um meio menos viscoso (MARGARITIS & PACE, 1985; GALINDO, 1994).

A fermentação no estado sólido (FES) tem sido sugerida como uma alternativa adequada à fermentação submersa como maneira de prevenir problemas ligados ao aumento da viscosidade do meio durante a produção, como mostram alguns autores. STREDANSKI & CONTI (1999), utilizaram grãos de malte, bagaço de maçã, bagaço de uva e cascas de frutas cítricas como substrato no processo de produção da goma xantana.

A utilização de substratos alternativos de baixo custo em processos fermentativos, tais como resíduos agroindustriais, permite a redução dos custos de produção, minimizando problemas ambientais, pois auxilia na destinação desses resíduos (WOICIECHOWSKI, 2001). Glicose e sacarose são usadas

como fontes de carbono preferenciais para a produção de biopolímeros, porém, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, tais como melão de cana, resíduos da indústria de soja, soro de leite, entre outros (NITSCHKE, 1997).

Este trabalho visa desenvolver um bioprocesso para a produção de goma xantana por FES em escala laboratorial a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais com uma cepa selecionada de *Xanthomonas campestris*.

Foram realizados estudos para a otimização de algumas variáveis do processo fermentativo de produção de goma xantana por FES em escala laboratorial a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais com objetivo de baixar os custos da matéria prima e de produção sem prejuízo da qualidade do produto final, para assim estimular o desenvolvimento de processos que valorizem e agreguem valor aos produtos agrícolas produzidos no Brasil e aos resíduos por eles gerados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O trabalho em questão visa desenvolver um bioprocesso para a produção do polissacarídeo goma xantana por FES em escala laboratorial e com uma cepa selecionada de *Xanthomonas campestris* utilizando-se como substrato, diversos resíduos agroindustriais nacionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar e selecionar a partir de algumas cepas de *Xanthomonas campestris* a melhor produtora de goma xantana.
- Caracterizar os diversos substratos/suportes a serem utilizados através de análises físico-químicas.
- Selecionar através de testes por fermentação o melhor substrato/suporte para a produção de goma xantana por FES.
- Desenvolver um bioprocesso para a produção de goma xantana em escala laboratorial, por FES utilizando o substrato selecionado.
- Acompanhar o processo com a cepa selecionada através do seu comportamento em estudo da cinética da produção da goma por FES, nas condições otimizadas (frascos de Erlenmeyer) com o suporte/substrato selecionado.
- Realizar testes com aeração forçada na condição otimizada a fim de confrontar com aeração por difusão (ocorrida em frascos Erlenmeyer).

Todas as etapas foram realizadas nos laboratórios da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Exopolissacarídeos microbianos

Exopolissacarídeos (EPS) microbianos, também chamados de biopolímeros são produzidos durante o crescimento de vários gêneros de bactérias. Foram descobertos depois de um trabalho pioneiro de um grupo de cientistas do Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, Illinois, Estados Unidos, em meados dos anos 50, que procuravam por microrganismos capazes de biosintetizar gomas hidrossolúveis de elevada importância comercial. Este estudo ocorreu porque os Estados Unidos precisavam complementar ou substituir o mercado de gomas naturais extraídas de algas marinhas (alginatos), árvores (goma arábica, goma caraia, goma tragacante), sementes (goma lacusta), de cereais (amido) por estes terem sua produção e disponibilidades afetadas por variações sazonais e adversidades climáticas, ficando sua oferta bastante variável. Estes cientistas reconheceram que a produção de gomas por fermentação poderia ser um modo mais seguro e de disponibilidade constante, independente de condições externas, permitindo também um maior controle de qualidade dos lotes. Ainda, um segundo motivo para a pesquisa, foi à superprodução de amido de milho nos Estados Unidos, gerando uma abundante fonte de carbono que poderia ser facilmente convertida em D-glicose para o uso durante as fermentações dessas gomas microbianas (IELPI *et al.*, 1993 e KENNEDY & BRADSHAW, 1984).

A biossíntese desses EPS está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas de meio ambiente (MOREIRA, 2002). Esses EPS desempenham diferentes papéis, que incluem:

- Proteger o microrganismo contra desidratação;
- Servir de barreira, impedindo que vírus e anticorpos se liguem a sítios específicos sobre a parede celular;
- Acoplar e neutralizar toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos;
- Atuar como fonte de carbono e energia;
- Converter o excesso de substrato em uma massa espumosa que é mais difícil de ser metabolizada por outros microrganismos;

- Interagir com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas (PACE, 1991).

Devido à diversidade em sua estrutura e propriedades, esses EPS são aplicados nos mais diversos setores como o de alimentos, farmacêutico, químico e petroquímico (SOCCOL *et al.*, 2000). São amplamente utilizados como espessantes, gelificantes, agentes de suspensão, colóides protetores, entre outros. Exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para sua aplicação final. Tais propriedades são determinadas por sua composição química, agrupamentos e ligações moleculares, seu peso molecular médio e sua distribuição (PACE, 1991).

Segundo ROTAVVA (2005) esses polissacarídeos de cadeias complexas também podem ser chamados de gomas devido a sua capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso. A importância e potencialidade do uso de gomas nos diversos segmentos industriais é consenso na literatura pertinente.

As gomas podem ser definidas como polissacarídeos de alto peso molecular de característica hidrofílica contendo milhares de unidades de monossacarídeos. Gomas são freqüentemente referidas como hidrocolóides devido a sua afinidade com a água, sendo essas dispersões muito viscosas por causa da dificuldade dessas moléculas quando ramificadas se movimentarem livremente na solução aquosa sem se prenderem umas nas outras. São capazes de se ligar a muitas moléculas de água devido a suas ramificações. Quando adicionadas em água, formam dispersões coloidais estáveis. São incapazes de formar géis sozinhos, somente ao combinar-se com o solvente adequado. (COOPER *et al.*, 2003). Essas gomas podem ser de origem microbiana, de vegetais terrestres ou marinhos (PASQUEL, 1999).

Uma grande variedade de biopolímeros conhecidos é produzida por microrganismos. Dentre eles destacam-se: goma gelana (produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea*), curdlana (produzida pela bactéria *Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes*), xantana (produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas sp*), welana (produzida pela bactéria *Alcaligenes sp*), dentre outras (SANDFORD, 1982 e 1979; SUTHERLAND, 1998).

3.2 *Xanthomonas campestris*

As bactérias do gênero *Xanthomonas* pertencem à família *Pseudomonaceae*. São essencialmente fitopatogênicas; com exceção da *Xanthomonas maltophilia* os outros organismos deste gênero são patógenos de plantas (HAYWARD, 1993; SWINGS *et al.*, 1993; GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000). São amplamente distribuídas e infectam mais de 240 gêneros de plantas mono e dicotiledôneas, algumas de interesse agrícola, causando imenso prejuízo às lavouras, como por exemplo, plantações de laranja (cancro cítrico), onde é responsável por causar lesões nos frutos, folhas e ramos (ABECITRUS; BRADBURY, 1984), na mandioca (bacteriose ou murcha-bacteriana) onde coloniza vascularmente as plantas, e pode atingir as raízes, causando escurecimento de seus vasos condutores (THEODORO *et al.*, 2002), além de infectar plantações de alface, repolho e feijões. A espécie *Xanthomonas campestris*, a mais numerosa e abundante do gênero, diferencia-se aproximadamente em 125 patovares, que infectam e causam doenças em vários hospedeiros (BRADBURY, 1984).

As células da *Xanthomonas sp.* apresentam a forma de bastonete, ficam alinhadas e ocorrem predominantemente isoladas. Têm em média 0,4 - 0,7 μm de largura por 0,7 – 1,8 μm de comprimento. São gram-negativas, e possuem um único flagelo, (1,7 – 3 μm de comprimento) sendo por isso, móveis. Esses microrganismos são quimiorganotróficos, ou seja, são capazes de utilizar como fonte de carbono diversos carboidratos e sais de ácidos orgânicos. Possuem ainda metabolismo estritamente aeróbio, requerendo uma molécula de oxigênio comoceptor final de elétrons. São não denitrificantes, sendo catalase-positiva e oxidase-negativa. Podem oxidar a glicose e o caminho de *Entner-Doudoroff* é predominantemente usado para o catabolismo da glicose (o caminho da pentose fosfato também acontece, mas usa só 8-16% da glicose total consumida); o ciclo do ácido tricarbóxico e os ciclos glioxilato estão presentes. Formam colônias geralmente lisas, amarelas e viscosas, devido à produção de um pigmento insolúvel em água conhecido como xanthomonadinas (GARCIA-OCHOA *et al.* 2000; FARIA, 2005).

A Figura 1 mostra a bactéria *Xanthomonas campestris*.

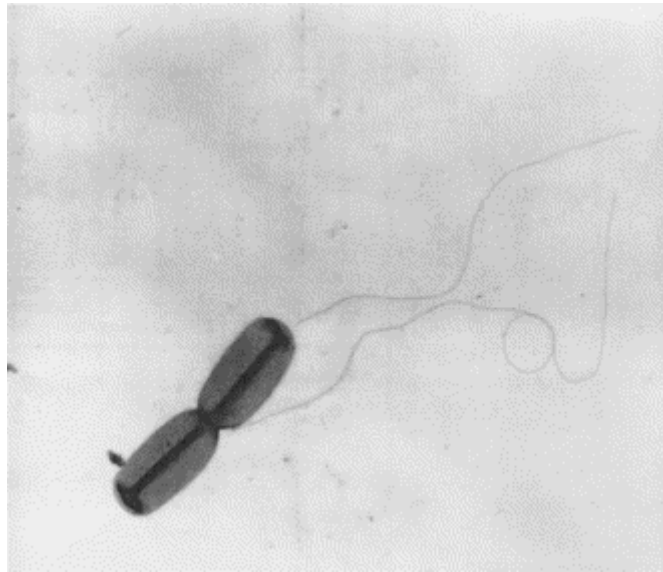


FIGURA 1. A bactéria *Xanthomonas campestris*. (Micrografia (x12000)).

FONTE: GARCIA-OCHOA et al., 2000.

De acordo com & REID, 1966, a bactéria *Xanthomonas campestris* tem a seguinte classificação:

Phylum	<i>Bactéria</i>
Classe	
Ordem	<i>Pseudomonadales</i>
Família	<i>Pseudomonadaceae</i>
Gênero	<i>Xanthomonas</i>
Espécie	<i>campestris</i>

3.3 A Goma Xantana

Goma xantana é nome comum que se dá ao EPS microbiano produzido por meio de fermentação pela bactéria *Xanthomonas campestris*. É o mais importante polissacarídeo microbiano do ponto de vista comercial, com uma produção mundial em torno de 30000 toneladas por ano, correspondendo a um mercado de 408 milhões de dólares. Somente nos Estados Unidos, estima-se um crescimento anual de 5 a 10% no consumo desta goma. Devido a sua estrutura única, a xantana exhibe propriedades reológicas bastante distintas e incomuns, como alta viscosidade e solubilidade, estabilidade frente a variações

de pH e temperatura, compatibilidade com muitos sais metálicos, ingredientes alimentícios e outros polissacarídeos usados como agentes espessantes (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; KALOGIANNIS *et al.*, 2003; KENNEDY & BRADSHAW, 1984; GLAZER & NIKAIDO, 1994; LO *et al.* 1997).

Desde o estabelecimento de sua produção comercial em 1964, este biopolímero se consagrou como agente espessante, estabilizante e gelificante da maior importância em aplicações industriais e de alimentos (KENNEDY & BRADSHAW, 1984).

A xantana é completamente atóxica, tendo sido aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos desde 1969, como aditivo em alimentos. No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto de Lei nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos (LIMA *et al.*, 2001; ROTAVVA, 2005).

Atualmente, os maiores produtores de xantana são os laboratórios Merck e Pfizer dos Estados Unidos, Rhône Poulenc e Sanofi-Elf da França e Jungbunzlauer da Áustria (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2001).

3.3.1 Estrutura da Goma Xantana

A goma xantana é um heteropolissacarídeo de alto peso molecular. Sua estrutura primária consiste em repetições de unidades de pentassacarídeos unidos formados por duas unidades de glicose, duas manoses e um ácido glicurônico, em proporções molares de 2.8:2.0:2.0 e proporções variadas de O-acetil e piruvil substituintes (Figura 2). Sua cadeia principal consiste em unidades de β -D-glucose com ligações nas posições 1 e 4. O trissacarídeo da cadeia lateral contém uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de resíduos de glicose da cadeia principal. Aproximadamente metade dos resíduos D-manose terminais contém um ácido pirúvico ligado, de distribuição indeterminada. A unidade D-manose ligada na cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-6. A presença de ácido acético e pirúvico produzem um polissacarídeo do tipo aniônico (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; SANDFORD & BAIRD, 1983).

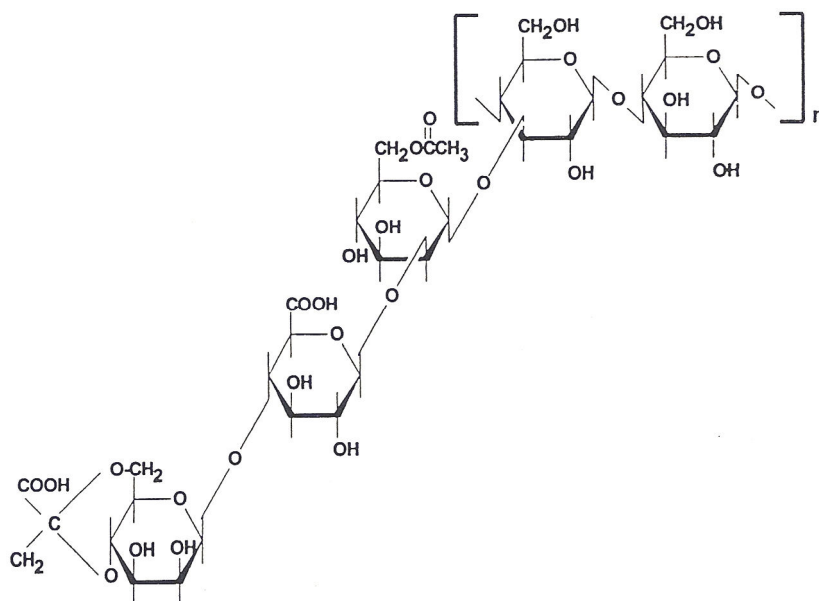


FIGURA 2. Estrutura básica proposta para a goma xantana

FONTE: BECKER *et al.*, 1998.

Aproximadamente 30% das ramificações possuem um grupo piruvato carregado. O peso molecular da xantana varia de 2 a 12 X 10⁶Da (Daltons), dependendo do processo fermentativo e da linhagem utilizada (LIMA *et al.*, 2001). Muito embora a estrutura básica da goma xantana esteja definida, muitos estudos mostram que variações nas condições de cultura e na variedade de *X. campestris* utilizada, podem variar a composição da molécula do polímero produzido (WOICIECHOWSKI, 2001). Isto mostra a dificuldade em manter um padrão de qualidade na produção de goma xantana por processos fermentativos. Esse fenômeno pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1. Comparação da composição de xantana obtida a partir de uma variedade normal e uma sub-variedade de *X. campestris*.

Variedade de <i>X. campestris</i>	Composição (g/100g)				
	D-glucose	D-manose	Ácido D-glucurônico	Acetato	Piruvato
Normal	37,0	43,4	19,5	4,5	4,4
Sub-variedade	37,7	42,9	19,3	3,7	2,5

FONTE: KENNEDY & BRADSHAW, 1984.

Alterações no grau de acetilação e de piruvilação podem causar uma variação de estrutura na goma xantana, sendo que dependendo do processo de produção, graus diferentes de substituintes acetil e piruvil são conseguidos.

A tabela 2 mostra a variação nos graus de acetilação e de piruvilação obtidos para as gomas xantanas de diversos fabricantes.

TABELA 2. Graus de substituintes acetil e piruvil para várias amostras de goma xantana comercial.

Amostra de xantana	Grau de piruvilação	Grau de acetilação
Keltrol ^a	0,39	0,9
Keltrol ^b	0,32	0,35
Kelzan ^a	0,40	0,34
Rhodopol ^b	0,44	0,67
Rhodigel ^b	0,39	0,53
Viskotan ^c	0,34	0,79

Fornecimento das amostras: ^aKelco Co. Inc. (San Diego, USA), ^bRhone-Poulenc Industries (Paris, França), ^cLohmann Fermentations (Cuxhaven, Alemanha).

FONTE: KENNEDY & BRADSHAW, 1984.

3.4 Produção

A xantana é produzida por cultivo aeróbio, a aproximadamente 28°C pelo patovar *Xanthomonas campestris*. A produção em escala laboratorial ou comercial da goma xantana visa simular o processo ocorrido na natureza sob condições físico-químicas otimizadas (JUNGBUNZLAUER; KENNEDY & BRADSHAW, 1984). O meio de fermentação deve conter vários componentes sob a forma de micronutrientes (como potássio, ferro e sais de cálcio) e macronutrientes como uma fonte de carbono e nitrogênio. Glicose e sacarose são as fontes frequentemente utilizadas. A concentração da fonte de carbono afeta o rendimento da xantana; uma concentração entre 2 e 4% é geralmente a mais utilizada (SANDERSON, 1981). Altas concentrações desses substratos podem inclusive inibir o crescimento celular (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2002; MAUGERI, 2001; ROTAVVA, 2005).

Meios contendo elevado teor de fonte de carbono e baixo teor de nitrogênio favorece o acúmulo de polímero (VASHITZ *et al.*, 1991). Em geral os processos industriais procuram utilizar meios que disponibilizem condições tanto para o crescimento como para o acúmulo de goma (DAVIDSON, 1978).

As temperaturas empregadas para a produção de xantana variam de 25-34°C. SHU e YANG (1990) concluíram que a temperatura ótima para a produção de xantana depende do meio de produção utilizado, sendo esta de 28°C para o meio otimizado por GARCIA-OCHOA *et al.*, (2000).

Pesquisadores apontam o pH neutro como ótimo para o crescimento da *Xanthomonas campestris*, sendo que este decresce para próximo de 5,0 durante a produção da xantana, devido aos grupos ácidos presentes no biopolímero. Um estudo dos efeitos do pH mostrou que seu controle melhora o crescimento celular, mas não tem efeito sobre a produção da xantana (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

A faixa de oxigenação recomendável para produção de xantana é de 1,5-3,5 mM O₂/L/minuto. Uma boa aeração é requerida devido ao aumento da viscosidade durante produção de xantana (LIMA *et al.*, 2001; ROTAVVA, 2005).

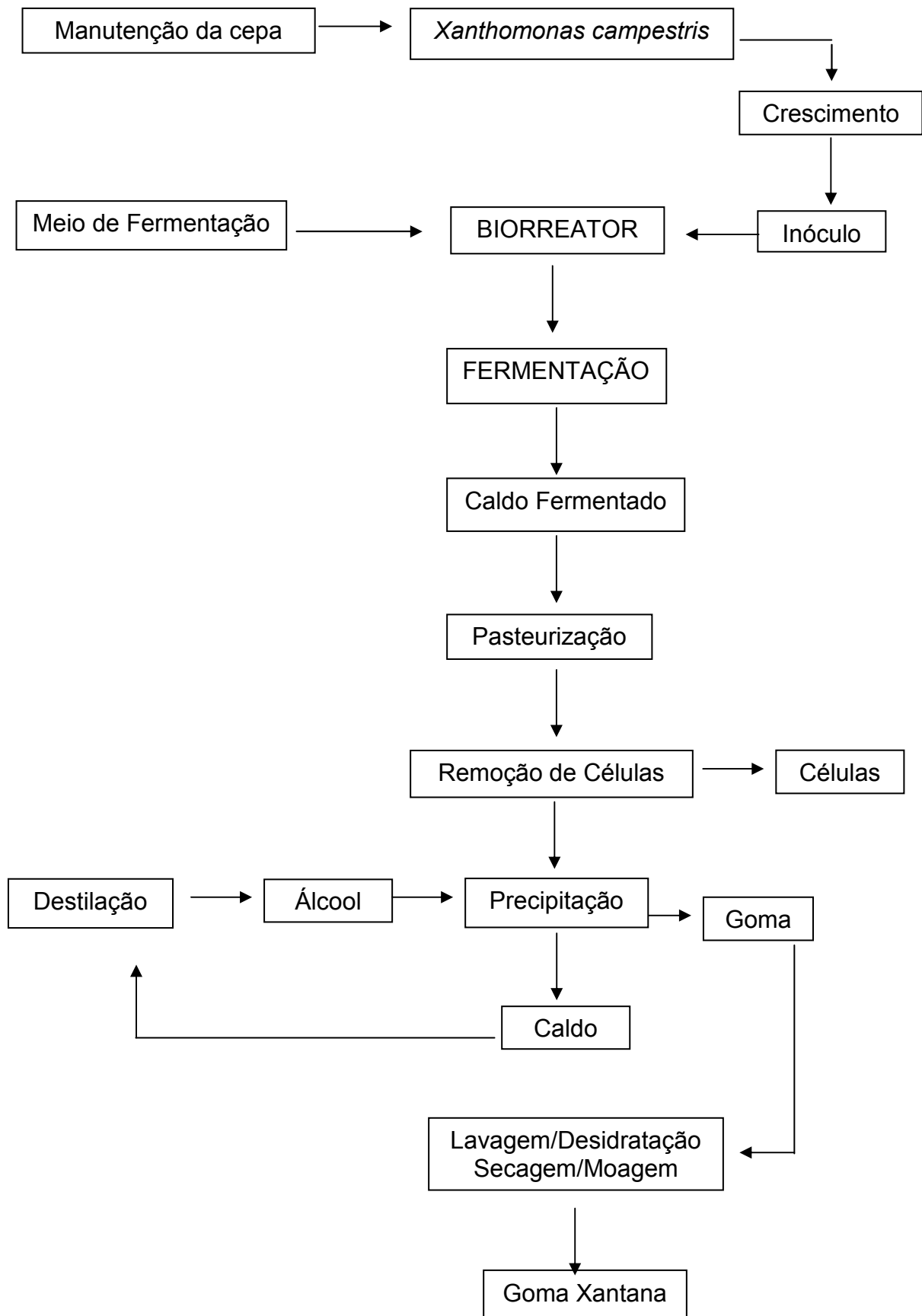


FIGURA 4. Fluxograma do processo de produção da Goma Xantana.

FONTE: GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000.

3.5 Propriedades da Goma Xantana

Este polissacarídeo possui propriedades de grande interesse tecnológico, como por exemplo:

- Capacidade de produzir soluções viscosas em altas e baixas concentrações;
- Excelente estabilidade térmica;
- Boa estabilidade frente a enzimas como as celulases, amilases e proteases;
- Excelente solubilidade e estabilidade em ampla faixa de pH;
- Compatibilidade e estabilidade com a maioria dos sais metálicos.

Estas propriedades são explicadas não só à sua capacidade de agregação e à formação de bastão rígido que as moléculas apresentam, mas também às diferentes conformações que a goma xantana pode assumir em solução (COTTREL *et al.*, 1980; PETIT, 1979).

3.5.1 Propriedades reológicas da Goma Xantana

A reologia ou “ciência do fluxo” é o estudo da deformação e do escoamento da matéria. 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 dos 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 medida da fricção interna de um fluido (PASQUEL, 1999; ROTAVVA, 2005).

O peso molecular, a estrutura, e a presença dos grupos acetil e piruvil têm a capacidade de alterar as propriedades reológicas das soluções, ou seja, dependem da natureza do polímero (CASAS *et al.*, 2000; MORADI-ARAGUI, 2000; DILTZ & ZELLER, 2001; NAVARRETE *et al.*, 2001).

A goma xantana é extremamente pseudoplástica, sendo esta uma característica extremamente desejada em inúmeras situações. Polissacarídeos

que possuem comportamento pseudoplástico provocam menos sensação de gomosidade na boca do que aqueles com comportamento newtoniano (é aquele em a viscosidade se mantém inalterada com o aumento da taxa de deformação) (NAVARRO, 1997; MORRIS, 1992). Em associação com hidrocolóides, como proteínas e outros biopolímeros, pode potencializar o efeito pseudoplástico (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

As moléculas de goma xantana adotam uma conformação helicoidal (simples ou dupla-hélice) podem ser descritas como hastes-rígidas sem tendência para associar-se, comportando-se como um espessante. Como as mais importantes propriedades são devido ao estado ordenado da macromolécula, as gomas xantana pode sempre ser usada na presença de eletrólitos (PENNA, 2002).

3.6 Aplicações da Goma Xantana

A goma xantana é largamente utilizada em diversos setores como em indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, entre outras, devido a suas propriedades reológicas superiores. É usada como agente de controle reológico em sistemas aquosos e estabilizante em emulsões e suspensões. Tem a capacidade de formar soluções altamente viscosas com baixa tensão de cisalhamento, alta pseudoplasticidade e rendimento (YOSHIDA *et al.*; 1993). Soluções de goma xantana são estáveis frente a uma ampla faixa de concentração de sais (superiores a 150g/L de NaCl), temperaturas (superiores a 90°C) e pH (faixa de 2 a 11) (LEE, 1996; ROSALAM *et al.*, 2005).

As propriedades toxicológicas e a segurança da goma xantana para uso alimentício e farmacêutico têm sido extensivamente estudadas. A xantana é atóxica e não inibe o crescimento. Não causa sensibilização e nem irritação na pele e nos olhos. Por estas razões, a xantana é aprovada nos Estados Unidos pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso como aditivo alimentar sem especificar a limitação da quantidade (KENNEDY & BRADSHAW, 1984). Em 1980, a Comunidade Econômica Européia incluiu seu uso como emulsificante/estabilizante em alimentos (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

3.6.1 Usos na Indústria Alimentícia

As aplicações de xantana na indústria de alimentos são muito amplas, sendo neste setor a sua maior utilização.

A xantana vem sendo utilizada numa grande variedade de alimentos com diversos propósitos, contribuindo com a melhora de atributos como a textura, palatabilidade e aparência, colaborando assim para uma maior aceitação do produto pelo consumidor.

A goma xantana tem sido utilizada como estabilizante em substitutos de clara de ovos elaborados com proteína de soro e gelatina, que geralmente são usados em merengues, *nougat* e doces, sem afetar o sabor e a aparência. A goma também funciona como estabilizante em sorvetes, encorpa e previne aderência em géis de frutas. Molhos de tomate para pizza e macarrão são formulados com goma xantana para obter alta viscosidade, mantendo o molho na superfície e inibindo a absorção pela massa (PENNA, 2002).

Na indústria de bebidas, a goma xantana tem a propriedade de aprimorar as características de palatabilidade de sucos cítricos e bebidas com aroma e sabor frutais. Em níveis mais altos, é excelente agente de suspensão para sucos de polpa de frutas ou com alto teor de sólidos suspensos. Nestes usos a concentração típica é de 0,001 a 0,15%.

Devido a sua excelente solubilidade tanto em soluções quentes ou frias tem um ótimo desempenho como estabilizante e pode ser utilizada nos mais diversos produtos instantâneos como sopas e molhos, sobremesas, bebidas e coberturas proporcionando uma viscosidade uniforme (MCNEELY & KANG, 1973; LAWRENCE, 1976; KENNEDY & BRADSHAW, 1984; PINCHES & PALLENT, 1986; ATKINSON & MAVITUNA, 1991; BECKER *et al.*, 1998).

Suas propriedades reológicas somadas a sua estabilidade frente a soluções ácidas e com altas concentrações de sais aumentam a vida de prateleira em emulsões água-óleo (enlatados) e em produtos como picles, tomate, cebola e mostarda. A goma xantana é o produto mais indicado como agente estabilizante, emulsificante e espessante nestas condições adversas, sendo efetiva em aperitivos em concentrações de aproximadamente 0,1%.

Devido também a sua alta estabilidade térmica, a goma xantana é amplamente utilizada como estabilizante e emulsificante de alimentos enlatados de frango, atum, presunto e batata formulados com molhos que foram processados a quente (BECKER *et al.*, 1998; YALPANI & SANDFORD, 1988, GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

A adição de goma xantana ao recheio de tortas e pãezinhos congelados à base de amido pode melhorar as propriedades estabilizantes prevenindo a sinérese e retrogradação depois de um ou dois ciclos de congelamento.

No setor de panificação, a goma é utilizada para aumentar a absorção de água durante o assamento e estocagem dos pães melhorando a massa e a textura final, estendendo a vida de prateleira (JUNGBUNZLAUER, 2006).

A goma xantana tem diversas aplicações na indústria de laticínios. Em combinação com a goma carragena ou outro hidrocolóide, é utilizada para estabilizar *milk-shakes*, iogurtes e sobremesas lácteas. Suas propriedades pseudoplásticas facilitam a produção de queijos cremosos e junto com galactomananas é utilizada em sobremesas cremosas prevenindo a sinérese. Quando combinada com a goma de alfarrobo, na proporção média de 0,1% de goma xantana e 0,25% de goma de alfarrobo e 0,4% de pirofosfato tetrassódico, em leite frio, sendo então refrigerado por alguns minutos, leva à reação de gelificação produzindo pudins instantâneos com excelente sabor e aroma, sem a presença de grumos ou sabor de amido. Em produtos congelados, a goma xantana concede excelente estabilidade e melhora a retenção de água durante os ciclos de congelamento e descongelamento reduzindo a formação de cristais de gelo. Em combinação com outros hidrocolóides, ainda concede a formação de uma textura mais lisa e uniforme (MCNEELY & KANG, 1973; LAWRENCE, 1976; KENNEDY & BRADSHAW, 1984; PINCHES & PALLENT, 1986; ATKINSON & MAVITUNA, 1991; BECKER *et al.*, 1998; PENNA, 2002).

A xantana é largamente utilizada em produtos de baixa caloria (*light*) como agente de retenção de água, melhorando a textura e a vida de prateleira, sem adicionar valor calórico ao produto. A propriedade de pseudoplasticidade de suas soluções facilita o bombeamento, o envase e a retirada do produto da embalagem para uso, e devido à alta viscosidade aparente dentro das

embalagens garante a estabilidade dos produtos final (YALPANI & SANDFORD, 1988, GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; JUNGBUNZLAUER, 2006).

A goma possui ainda aplicações na nutrição animal. A goma é utilizada em pequenas concentrações (0,05 – 2,0%) para estabilizar suspensões de leite em pó utilizadas para substituir o leite materno durante a desmama em filhotes de diversos animais como bezerro e leitões, ajudando essas suspensões a estabilizar a emulsificação de substâncias insolúveis. Em concentrações de 0,1 a 0,4%, é utilizada em combinação com a goma lacusta e goma guar como estabilizante de emulsões de alimentos enlatados a base de carne, evitando o fenômeno da sinerése (JUNGBUNZLAUER 2006).

3.6.2 Usos na Indústria Farmacêutica

A goma xantana é um excelente agente estabilizante e espessante para formulações farmacêuticas como xaropes, cremes e emulsões. Em pastilhas a goma xantana é utilizada para prolongar o tempo de contato do composto ativo e em comprimidos pode ser usada para criar um efeito de liberação prolongada da droga (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; JUNGBUNZLAUER, 2006).

3.6.3 Usos na Indústria de Cosméticos

A goma xantana é ideal para estabilizar e encorpar cremes e géis dentais, fornecendo uniformidade a pastas de dente, tornando seu aspecto mais liso e uniforme facilitando sua saída do tubo. Pode ser utilizada ainda para estabilizar emulsões, melhorar a retenção de água e a textura em cremes e loções. Fornece alta viscosidade em baixas concentrações a pastas e cremes, ajudando-os a manter esta forma. Em xampus é utilizada para ajustar a viscosidade e a propriedade de escoamento, e como agente suspensor quando há a presença de substâncias insolúveis como pigmentos ou outros componentes ativos (McNEELY & KANG, 1973; KENNEDY & BRADSHAW, 1984; JUNGBUNZLAUER, 2006).

3.6.5 Aplicações Industriais

A xantana também encontra aplicação em uma grande variedade de processos industriais, sendo aplicada em grande escala na recuperação secundária e terciária do petróleo. É utilizada como ingrediente da lama de perfuração, reparação e acabamento de poços petrolíferos e vem sendo usada na recuperação secundária de hidrocarbonetos (COTTRELL & KANG, 1978).

Devido a sua excelente compatibilidade com outros sais e a sua resistência a degradação pela temperatura, seu uso é viável como aditivo para óleos de corte, reduzindo as perdas por fricção no processo de corte de materiais duros.

A goma xantana é um excelente agente suspensor para esmaltes cerâmicos e outras misturas difíceis de manter em suspensão. A sua excelente compatibilidade com componentes de esmaltes cerâmicos, melhora a moagem do material, aumenta a adesão a úmido, controla o tempo de secagem e reduz imperfeições na superfície das peças. Devido a essas propriedades, torna-se o produto apropriado para uso em produtos de limpeza e polidores. Favorece a suspensão de abrasivos e melhora o escoamento e o espalhamento do produto. Em tintas a base de água é utilizada para estabilizar os pigmentos e controlar suas propriedades de escoamento, uniformizando a migração da cor nos fios de tecidos.

Na agricultura, é utilizada como estabilizante em pulverizadores fungicidas, herbicidas, pesticidas e fertilizantes, controlando o tamanho das gotículas. Também melhora aderência entre o componente ativo e a colheita aumentando o tempo de contato entre eles. Na indústria de papel, a goma xantana pode ser utilizada como agente suspensor e de controle reológico (McNEELY & KANG, 1973; KENNEDY & BRADSHAW, 1984; BECKER *et al.*, 1998; JUNGBUNZLAUER, 2006).

Com os avanços tecnológicos, prevê-se que os usos deste produto venham a aumentar significativamente nos próximos anos, ocorrendo também novas aplicações (ICPDCA, 1999).

3.7 A Importância do Inóculo em Processos Fermentativos

Em processos fermentativos, uma das etapas iniciais é produção do inóculo. Segundo HUNT & STIEBER (1986), a produção do inóculo é a etapa de preparação de uma população de microrganismos a partir de uma cultura estoque a fim de se obter células em estado fisiológico adequado para a inoculação do fermentador na etapa de produção.

A qualidade e o tipo de inóculo exercem uma importante influência nos processos fermentativos. Muitos fatores decorrentes do processo de inoculação podem influenciar nos resultados de uma fermentação. A concentração de células no inóculo (densidade ou tamanho do inóculo), o estado fisiológico, a idade das células e ainda, a morfologia do microrganismo são fatores importantes nas etapas de preparo do inóculo em um processo fermentativo. As características que o inóculo deve possuir dependem do processo fermentativo em que ele será utilizado e do produto de interesse na fermentação (CALAM, 1976; PAMBOUKIAN, 1997).

Um inóculo em condições adequadas, ou seja, na quantidade e concentrações corretas conduz a condições ótimas de crescimento e a bons resultados no processo fermentativo. Um inóculo de má qualidade pode levar a resultados inesperados, com uma diminuição significativa da produtividade e do rendimento do processo (PARTON & WILLIS, 1990).

De acordo com PAMBOUKIAN (1997), existem diversos trabalhos que enfocam a importância da etapa de inoculação em processos fermentativos, mostrando que o tipo e a qualidade do inóculo têm um efeito considerável no resultado da fermentação, pois podem influenciar na morfologia de crescimento do microrganismo durante o processo.

Na literatura encontram-se diversos estudos sobre a influência da concentração de células do inóculo no desempenho de processos fermentativos.

HUNT & STIEBER (1986) relataram o processo de produção industrial de vitamina B₁₂, mostrando a influência da concentração celular de *Pseudomonas denitrificans* do inóculo na produção desta vitamina. O aumento da concentração celular levou a diminuição na produtividade da vitamina B₁₂.

WOICIECHOWSKI (2001), durante o processo de produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*, utilizando uma concentração de 4% (v/v) de inóculo em relação ao meio de fermentação conseguiu uma produtividade final de 14g/L de goma.

Outro fator importante a ser analisado é a influência da idade das células no processo. NAMPOOTHIRI *et al.* (2003), mostraram que a produção de goma gelana é influenciada pela idade das células do inóculo. O meio de produção foi inoculado com inóculos de várias idades (8, 12, 4, 6, 20 e 24 horas). O máximo rendimento em goma gelana foi obtido com a utilização de um inóculo de 20 horas.

REISMAN (1988) cita que todas as etapas de produção do inóculo devem ser monitoradas a fim de se manter a viabilidade e a produtividade das células. Quanto maior o número de etapas envolvidas no processo, maior é a chance de o microrganismo não se manter suficientemente ativo (produtivo), particularmente no caso de cepas mutantes, que são geralmente instáveis (CORBETT, 1987).

3.7.1 O Inóculo na produção da goma xantana

No processo fermentativo de produção da goma xantana, células de uma cultura pura de *X. campestris*, são inoculadas ao meio de produção contendo os nutrientes necessários. A preparação do inóculo ocorre através da transferência do microrganismo por meio de uma alça metálica a partir um meio sólido de manutenção para um pequeno volume de um meio líquido complexo. A incubação do inóculo deve ser limitada há poucas horas a fim de se prevenir uma significativa produção de goma.

Durante a produção do inóculo, o objetivo é aumentar a concentração de células, limitando a produção da xantana, pois o biopolímero liberado no meio envolve as células dificultando a transferência de nutrientes e oxigênio levando as células à morte (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; PONS *et al.*, 1989, 1990).

Depois do estágio do inóculo, a fermentação ocorre por 48-96 horas sob condições assépticas. O polímero é sintetizado, principalmente ao cessar o crescimento microbiano (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; LIMA *et al.* 2001).

3.8 Fermentação no Estado Sólido (FES)

3.8.1 Definição e características gerais da FES

A fermentação no estado sólido, tradução do inglês “*solid state fermentation*” ou “*solid state culture*” pode ser definida como uma técnica de crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida), onde a quantidade de líquido contido nesta matriz deve ser mantido a um nível correspondente à atividade de água. Assim, é assegurado o conveniente crescimento e o metabolismo celular que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz. O suporte sólido pode ser constituído por um substrato naturalmente úmido ou por uma matriz inerte capaz de absorver os nutrientes que se encontram em solução reproduzindo as condições de baixa atividade de água e alta transferência de oxigênio (KOLICHESKI, 1995; OOIJKAAS *et al.*, 2000; VANDENBERGHE *et al.*, 2000; SOCCOL *et al.*, 2002). A FES tenta reproduzir as condições do ambiente microbiológico natural do microrganismo (COUTO & SANROMÁN, 2006).

O substrato (ou matriz sólida) deve ter algumas características que possibilitem o maior rendimento do processo. A principal peculiaridade é o alto grau de acessibilidade do microrganismo a todo o meio e, para tanto, de suas características mais importantes, destacam-se a porosidade, o tamanho e o formato das partículas. O tamanho da partícula, ou seja, a granulometria do material deve permitir a circulação de ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos, os quais poderiam vir a prejudicar o rendimento do processo. A porosidade do material deve permitir a retenção de água pelo substrato, que tem a função de facilitar o transporte de enzimas e metabólitos por entre o meio e o microrganismo. A retenção de água corre por higroscopia ou capilaridade. (LIMA *et al.*, 2001; SOCCOL *et al.*, 1992). Geralmente, suportes com partículas de granulometria pequena têm maior área superficial permitindo um maior acesso do microrganismo ao substrato, mas se a granulometria for muito pequena, isso pode resultar em uma compactação do substrato, dificultando o crescimento celular. Em contraste, partículas maiores permitem uma maior circulação de ar, mas limitam o acesso do microrganismo

ao substrato. Por essa razão, a escolha do tamanho da partícula e do substrato deve ser feita para cada fermentação em particular (PANDEY, 1999; ZADRAZIL & PUNIA, 1995).

A natureza do substrato sólido empregado na FES é um fator determinante para a fermentação e sua seleção depende de vários fatores, principalmente aqueles ligados ao baixo custo deste substrato e sua disponibilidade na região. Diversas matérias-primas podem ser empregadas na FES, mas devido a grande quantidade de resíduos gerados pelo setor agroindustrial e seu baixo custo, inúmeras pesquisas têm sido feitas a fim de se utilizar estes resíduos que vêm demonstrando imenso potencial para uso em FES. São exemplos, alguns dos substratos de origem agroindustrial que podem ser utilizados na FES: polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros (AURIA *et al.*, 1992; BARRIOS-GONZALES *et al.*, 1993; ECHEVARIA *et al.*, 1991; LIU & TZENG, 1999; PANDEY *et al.*, 1994; PASTRANA *et al.*, 1995; SOCCOL, 1992; ROUSSOS *et al.*, 1993; SARRETE *et al.*, 1992; SMAIL *et al.*, 1995; ZADRAZIL & PUNIA, 1995).

A utilização destes resíduos agroindustriais além de fornecer substratos alternativos, a baixo custo minimiza problemas ambientais causados pelo seu descarte no meio ambiente, transformando um resíduo poluente em um subproduto estável de valor comercial (PANDEY *et al.*, 1999a; MAIORELLA *et al.*, 1984).

A FES oferece inúmeras vantagens sobre a fermentação submersa, por se tratar de uma técnica mais simples e barata. A tabela 3 mostra um comparativo entre as vantagens e as desvantagens entre a FES e a fermentação submersa.

TABELA 3. Comparativos entre fermentação no estado Sólido e Fermentação Submersa.

Fermentação no Estado Sólido	Fermentação Submersa
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Profundidade do meio limitado	Profundidade do meio variável com o biorreator
Consumo limitado de água, baixa a_w , sem efluentes	Grandes quantidades de água consumida e descarte de efluentes
Baixa capacidade de transferência calor	Fácil controle de temperatura
Fácil aeração e grande área de contato ar/substrato	Aeração requer fluxo elevado
Substrato tampão	Fácil controle de pH
Necessita projetos para o <i>design</i> de novos equipamentos	Equipamentos industriais disponíveis
Inoculação de esporos, batelada	Fácil inoculação, processo contínuo
Risco de contaminação por fungos de crescimento lento	Risco de contaminação por uma única célula bacteriana
Baixo consumo de energia	Elevado consumo energético
Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos	Grandes volumes e elevado custo tecnológico

FONTE: HÖLKER *et al.*, 2004; RAIMBAULT, 1997; ROUSSOS *et al.*, 1993; RODRIGUES, 2006.

3.8.2 Aplicações da FES

Os processos de fermentação no estado sólido têm um potencial econômico considerável na produção de produtos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola (PANDEY *et al.*, 1992). Além disso, esses procedimentos são de interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo

(CASTILHO *et al.*, 2000). A Tabela 4 mostra a aplicação da FES em diversos segmentos.

TABELA 4. APLICAÇÕES DA FES EM DIFERENTES SETORES ECONÔMICOS

SETOR	APLICAÇÃO	EXEMPLOS
Indústria agro-alimentar	Fermentações de alimentos	Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, queijos fermentados
	Produção de Cogumelos	<i>Agaricus, Pleurotus, Shiitaki</i>
	Bioconversão de resíduos	Compostagem, detoxificação, ensilagem
	Aditivos alimentares	Aromas, gorduras essenciais, ácidos orgânicos
Agricultura	Biocontrole, bioinseticidas	<i>Beauveria, Metarrhizium, Trichoderma</i>
	Crescimento de plantas Micorrização	Giberilinas, <i>Rhizobium, Trichoderma</i> Inóculo de plantas
Fermentação industrial	Enzimas	Amilases, celulases, pectinases, proteases, xilanases
	Antibióticos	Penicilina, probióticos
	Ácidos Orgânicos	Ácidos cítrico, fumárico, gálico, láctico
	Etanol	<i>Schwanniomyces sp.</i>
	Metabólitos fúngicos	Hormônios, alcalóides

FONTE: RAIMBAULT, 1997.

3.9 Utilização de Resíduos Agroindustriais Nacionais

A disposição no meio ambiente, de resíduos gerados pelo setor agroindustrial, tem resultado em freqüentes relatos de problemas de poluição ambiental.

Tais problemas, juntamente com relação à importância da prevenção da poluição ambiental, levaram ao desenvolvimento de pesquisas que gerassem medidas efetivas na minimização dos níveis de poluição. Entre essas medidas, podem ser citadas as seguintes:

- minimização da quantidade de resíduo gerada;
- tratamento adequado dos resíduos antes da disposição no ambiente;
- aproveitamento dos resíduos em outras atividades.

Atualmente, as alternativas de valorização de resíduos através do aproveitamento em diversas atividades têm sido muito incentivadas, já que podem contribuir positivamente para a minimização da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica desses resíduos que, até então, eram considerados simplesmente como descartáveis (DAMASCENO *et al.*, 2003; IMPACTOS, 2006).

WOICIECHOWSKI (2001) cita que, no cenário nacional existem inúmeras oportunidades para o estabelecimento de atividades voltadas ao beneficiamento e/ou reprocessamento de bioresíduos, entre os quais podem ser citados, por exemplo, bagaço de cana e de mandioca, palha de cereais, bagaço de laranja, polpa de maçã, o caule e o sabugo do milho, serragem, cavacos de madeira de outros resíduos de atividades florestais, além de diversos tipos de papéis recicláveis. Todos esses materiais são ricos em substâncias de elevado valor energético, como a celulose, as hemiceluloses, a lignina, óleos essenciais e extrativos, amido, além de açúcares diretamente fermentescíveis.

O Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná vem ao longo da última década, realizando estudos com o objetivo de valorizar os produtos agrícolas do Estado do Paraná, agregando valor a produtos e resíduos. Dentre as linhas de pesquisa, destacam-se aquelas que se utilizam de processos biotecnológicos focadas em viabilizar substratos alternativos para a obtenção de produtos de alto valor comercial. Diversas

biomoléculas foram obtidas através deste processo, como: produção de ácidos orgânicos como o ácido cítrico (RODRIGUES, 2006), o ácido fumárico (CARTA, 1998; SOCCOL, 1994), cogumelos comestíveis (BEUX, 1995; TONIAL, 1997; FAN, 1999), aromas (MEDEIROS, 1998), enzimas como a α -amilase e amiloglicosidase (SPIER, 2005), hormônios vegetais como a giberelina (MACHADO *et al.*, 2000), entre outros.

A utilização de resíduos pode diminuir os custos de produção para níveis competitivos em relação aos já produzidos por diversas empresas, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e aos custos do tratamento (MERCADÉ & MANRESA, 1994; MAKKAR & CAMEOTRA, 1999; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

Finalmente, deve-se considerar que o Brasil é um país essencialmente agrícola e que, portanto, a quantidade e a facilidade de acesso aos subprodutos agroindustriais são bastante significativas.

3.9.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar

O setor sucroalcooleiro (usinas açucareiras e destilarias) produz como resíduo sólido, o bagaço de cana - resíduo da moagem da cana-de-açúcar - obtido após a extração do caldo. É considerado o maior resíduo da agroindústria brasileira e representa aproximadamente 30% da cana integral moída. É constituído de fibra, água e sólidos dissolvidos. A quantidade de bagaço obtida varia de 240 kg a 280 kg de bagaço por tonelada de cana (COPERSUCAR, 2006; MATOS, 2005).

Estima-se que, a cada ano, sobrem de 5 a 12 milhões de toneladas deste material. As próprias usinas utilizam de 60% a 90% deste bagaço como fonte energética (substitui o óleo combustível no processo de queima nas caldeiras) e para a geração de energia elétrica (CORTEZ *et al.*, 1992).

O bagaço, resíduo lignocelulósico fibroso, remanescente dos colmos da cana-de-açúcar, obtém-se na saída do último moinho da usina açucareira e constitui um conjunto heterogêneo de partículas de diferentes tamanhos, que oscilam entre 1 e 25 mm. Esta fração é portadora de elementos estruturais que permitem o uso do bagaço na indústria de derivados (produção de polpa, papel e produtos aglomerados; ração animal; combustível industrial). Nos últimos

anos, surgiu a tendência de aumentar o grau de preparação da cana, com o objetivo de extrair uma maior quantidade de açúcar. De acordo com a ABIPTI (1999), o bagaço de cana-de-açúcar é constituído por quatro frações, cuja percentagem média é apresentada na Tabela 5:

TABELA 5. Composição do Bagaço de Cana-de-Açúcar

COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO	%
<i>Fibra ou bagaço</i> : fração sólida orgânica insolúvel em água, composto de celulose, hemicelulose e lignina.	45
<i>Sólidos insolúveis</i> : compostos orgânicos (terra, pedras e outras matérias estranhas) originárias da colheita e do solo.	2-3
<i>Sólidos solúveis</i> : fração que se dissolve na água, composta por sacarose, não extraída da usina.	2-3
<i>Água</i> : retida no bagaço por mecanismos de adsorção e de capilaridade.	50

FONTE: ABIPTI, 1999.

3.9.2 Caldo de Cana

No Brasil, o açúcar e o etanol são produzidos a partir da cana-de-açúcar. Uma das primeiras etapas para sua produção em usinas sucroalcooleiras é a extração do caldo. Este processo denomina-se moagem.

Durante o processo de moagem da cana o líquido obtido é chamado caldo de cana. Este processo consiste em deslocar o caldo contido na cana fazendo a cana passar entre dois rolos, submetidos à determinada pressão e rotação, sendo o volume gerado menor que o volume da cana.

O caldo de cana é rico em açúcares, sendo predominante a sacarose, açúcar não-redutor. Os açúcares redutores compõem-se primordialmente de glicose e frutose. Esses açúcares redutores se encontram em proporções quase iguais nas canas imperfeitamente maduras. À medida que avança o amadurecimento, seus teores diminuem, podendo não ser identificados nas canas perfeitamente maduras. O teor de frutose diminui primeiro, até desaparecer. Por influência dos fatores que influem na composição da matéria-prima, a cana pode conter: 74,5% de água, 14% de açúcares (12,5 de

sacarose, 0,9 de glicose e 0,6 de frutose), 10% de fibras e o restante dividido entre matérias minerais, compostos nitrogenados, ceras, pectinas e ácidos.

O caldo obtido pela moagem da cana encerra entre 78 e 86% de água, 10 a 20% de sacarose, 0,1 a 2% de açúcares redutores, 0,3 e 0,5% de cinzas e entre 0,5 e 1% de compostos nitrogenados. A composição do caldo de cana é complexa e muito variável de uma região para outra e de um país para outro. O caldo bruto é opaco, de cor verde-amarelada e viscoso. Contém açúcares, colóides, proteínas, pentosanas, pectinas, gorduras, gomas, ceras, albuminas, silicato coloidal, cores (clorofila, antocianina). O caldo é um sistema coloidal complexo, no qual o meio de dispersão é a água da constituição dos tecidos da cana. Alguns constituintes estão em dispersão molecular, tais como sacarose, glicose, frutose e sais minerais (matérias solúveis). Os outros são em estado de dispersão coloidal ou em suspensão: proteínas, cores, gomas, pectinas, ceras, bagaço, ar e outras impurezas. O caldo é ácido, geralmente de pH 4,8 a 5,5. A acidez aumenta nas canas queimadas, doentes, verdes (não maduras), atacadas por insetos, cortadas de vários dias (acidez artificial e microbiana) (SEBRAE, 2006; COPERSUCAR, 2006).

Devido a essa grande quantidade de sacarose presente no caldo, pode-se utilizá-lo como substrato para fermentações, como por exemplo, na obtenção de goma xantana (FARIA *et al.*, 2005).

3.9.3 Bagaço de Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é uma cultura de elevado interesse econômico mundial, por sua ampla utilização na agropecuária, grande adaptação a condições edafoclimáticas, e pela alta produção de fécula por unidade de área; além disso, tem um importante papel na subsistência humana (CONCEIÇÃO, 1987).

Historicamente, o Brasil é um dos maiores produtores de mandioca do mundo, com um dos melhores rendimentos por unidade de área (REIS, 1987). É cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do país, em termos de área cultivada, e o sexto em valor de produção. Em 2004, a produção nacional foi de 23,9 milhões de

toneladas de mandioca segundo o IBGE (ABAM, 2004; PRADO, 2002; PANDEY *et al.*, 2000).

O bagaço de mandioca é o resíduo sólido composto pelo material fibroso da raiz, contendo parte da fécula que não foi possível extrair no processamento. É gerado na etapa de separação da fécula e, por embeber-se de água, apresenta volume maior do que a própria matéria-prima, contendo cerca de 75% de umidade (CEREDA, 1994). A Tabela 6 mostra a composição físico-química do bagaço de mandioca em g/100 de matéria-seca (MS):

TABELA 6. Composição físico-química do bagaço de mandioca.

Composição (g/100g MS)	1994 ¹	1994 ²	1997 ³
Umidade	5,02	9,52	10,70
Proteína	1,57	0,32	1,60
Lipídios	1,06	0,83	0,53
Fibras	50,55	14,88	22,20
Cinzas	1,10	0,66	1,50
Carboidratos	40,50	63,85	63,40

FONTE: SOCCOL, 1994¹; CEREDA, 1994²; STERTZ, 1997³.

A Tabela 7 mostra valores médios de determinações físico-químicas de bagaços de mandioca originários de indústrias de alguns estados.

TABELA 7. Valores médios de determinações físico-químicas de bagaços de mandioca originários de indústrias de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, expressas em matéria seca.

Composição (%)	BM – SP	BM- MG	BM – PR
Umidade	9,42	14,82	9,52
Cinzas	0,83	3,77	0,66
Amido	69,76	75,00	63,85
Lipídios	0,65	0,28	0,83
Nitrogênio	0,24	1,86	0,32
Fibras	11,08	7,81	14,88

FONTE: CEREDA, 1994.

Os resíduos de mandioca podem ter diversas aplicações: pode ser usado como ração animal, e devido às suas características químicas, por ser um material essencialmente orgânico com altíssima degradabilidade, pois é essencialmente carboidrato (na forma de amido), pode ter empregos biotecnológicos, usado como substrato na produção de biomassa microbiana, além de metabólitos primários ou secundários em processos fermentativos (WOIECHOWSKI, 2001).

3.9.4 Polpa Cítrica

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja e seus subprodutos, disputando com os Estados Unidos a hegemonia nesse mercado. O Estado de São Paulo concentra 80% da produção de frutas e 90% da capacidade de processamento. Atualmente, 10 indústrias afiliadas a ABECITRUS (Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos), respondem por 98% da produção mundial de suco de laranja (ABECITRUS, 2006; SILVA *et al.*, 1995).

Apesar de o suco ser o principal produto da laranja, vários subprodutos com valor comercial são obtidos durante o seu processo de fabricação. Entre ele, estão os óleos essenciais (óleos voláteis extraídos da casca da laranja – 1,79%), limoneno (fração oleosa obtida da destilação dos resíduos úmidos da

laranja - 0,92%) e o farelo de polpa cítrica (obtido por meio do tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco – 49,24%). Eles possuem diferentes aplicações, as quais incluem a fabricação de produtos químicos e solventes, aromas e fragrâncias, tintas, cosméticos e complemento para a ração animal.

O farelo de polpa cítrica peletizado (PC) ou farelo de casca de laranja é um subproduto de grande produção nacional que inicia seu período de disponibilidade em maio e termina em janeiro, época de entressafra de grãos e de confinamentos de bovinos de corte. A polpa cítrica é o subproduto da fabricação de suco concentrado pela indústria citrícola, sendo constituída por cascas, sementes, bagaço e frutas descartadas e sua principal matéria prima é a laranja. O resíduo sólido do processamento da laranja equivale a 50% do material processado onde a polpa é triturada e seca até chegar a 12% de umidade e o produto é peletizado. Sua exportação anual pelo Brasil gira em torno de um milhão de toneladas por ano. (ABECITRUS, 2006).

Uma vez que estes resíduos são ricos em carboidratos e outros nutrientes, podem servir também como substrato para a produção de diversas biomoléculas de interesse industrial por FES (KOLICHESKI, 1995; SOCCOL, 1996; PANDEY *et al.*, 2000; VANDENBERGHE *et al.*, 2000). Dentre as biomoléculas pesquisadas, pode-se citar: ácido cítrico (RODRIGUES, 2006), goma xantana (BILANOVIC *et al.*, 1994).

3.9.5 Soro de Queijo

Soro de queijo é o subproduto resultante da fabricação de queijos pela indústria de laticínios, sendo obtido numa proporção média de 9:1 v/v da quantidade de queijo fabricada. Esse subproduto contém cerca de 6,0-6,5% de sólidos totais, sendo cerca de 4,5-5,0% de lactose, 0,8-1,1% de proteína, 0,03-0,1% de gordura, 0,5-0,8% de matéria mineral e 0,2-0,8% de ácido láctico (MORESI, 1994).

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo-ABIQ, a produção anual de queijos no Brasil tem se mantido em cerca de 350.000 toneladas nos últimos anos, o que corresponde à produção de cerca de 3,5 milhões de toneladas de soro de queijo (PONSANO *et al.*, 1995).

É o constituinte de maior importância, tanto pelo volume gerado, como pela sua carga poluidora, que lançada em corpos receptores pode causar um grave problema ambiental. Aproximadamente 80% do volume do leite destinado à fabricação de queijos se transformam em soro. O soro de queijo contém metade do extrato seco do leite, representado por lactose, proteínas solúveis e sais (PAOLUCCI, 1991). Por se tratar de um subproduto de baixo valor econômico, o soro era simplesmente lançado nos cursos de água sem nenhum tratamento prévio (SISO, 1996).

Dentre as tecnologias disponíveis para aproveitar o soro de queijo, pode-se utilizar na alimentação animal e como substrato para a fermentação (PONSANO, 1982). A utilização de soro de queijo representa uma importante fonte de matéria-prima barata para a produção de diversos produtos de interesse comercial, já que este produto muitas vezes é descartado, gerando um efluente de grande potencial poluente (PAOLUCCI, 1991).

Algumas aplicações têm sido sugeridas para a utilização do soro de queijo como substrato em processos biotecnológicos. Como exemplos podem ser citados biopolímeros, como a goma xantana (THORNE *et al.*, 1988; NITSCHKE *et al.*, 1997), goma gelana (FIALHO *et al.*, 1999), cultivo de biomassa, como a *Kluyveromyces marxianus* (BEAUSEJOUR *et al.*, 1981), entre outros.

3.9.6 Água de Maceração do Milho

A água de maceração do milho ou “*corn steep liquor*” é um subproduto do processamento dos grãos de milho obtido durante a lavagem e embebição dos grãos quando do fracionamento em amido e germe (óleo). Os grãos de amido solúveis são liberados e submetidos a uma suave fermentação láctica por bactérias dos próprios grãos de milho. É uma solução concentrada que contém em sua composição química carboidratos solúveis, aminoácidos e sais minerais, correspondendo a 40% de sólidos totais. É utilizada principalmente na alimentação de ruminantes, galinhas e em processos fermentativos, por ser fonte dos principais aminoácidos, nutrientes necessários às várias espécies de microrganismos.

A composição da água de maceração pode variar dependendo do fabricante, mas uma composição típica é mostrada na Tabela 8.

TABELA 8. Composição típica da água de maceração do milho ou “corn steep liquor”.

Matéria seca	50,7%
pH	3,9
Proteína	40,8% (na base seca)
Ácido láctico	16,0% (na base seca)
Açúcares redutores	12,8% (na base seca)
Compostos diversos	30,4% (na base seca)

FONTES: RAYMOND & YOUNG, 1998.

Dentre os açúcares redutores presentes, destaca-se lactose e em menor quantidade, glicose.

Foi utilizado pela primeira vez em fermentações em torno de 1940 para a produção de penicilina. A composição da penicilina varia de acordo com a qualidade do milho e as condições do processo. Os extratos concentrados contêm em média 4% (p/v) de fonte de nitrogênio, incluindo uma elevada taxa de aminoácidos, vitaminas e sais minerais além de muitos precursores desse antibiótico como fenilalanina e fenetilamina.

Alguns açúcares residuais podem ser convertidos a ácido láctico (9-20%) por bactérias contaminantes e tem sido utilizada como suplementação em muitos processos fermentativos por seu custo relativamente barato, \$55,00 a tonelada na forma semi-sólida (WAITES *et al.*, 2001; WHITE, 1986; CORN PRODUCTS, 2005).

3.9.7 Farelo de Soja

A soja é uma das mais importantes culturas agrícolas mundiais, sendo sua produção destinada para a obtenção de óleo e farelo pela indústria alimentícia. É uma planta de origem oriental, que é consumida em larga escala nos países asiáticos, sob as mais diversas formas. Foi introduzida nos Estados Unidos da América do Norte, sendo a principal fonte de matéria-prima para a extração de óleo vegetal comestível (TEIXEIRA, 2005; POLINUTRI, 2006).

A soja é constituída principalmente de lipídeos e proteínas, e esta última fração tem recebido cada vez mais atenção nas últimas décadas. A literatura aponta que nenhum outro vegetal, e nem mesmo fontes animais, podem fornecer uma quantidade tão grande de proteínas por acre, por ano, quanto a soja. Não só a quantidade, mas também a qualidade desta proteína deve ser ressaltada, já que a soja apresenta em sua composição quase todos os aminoácidos essenciais (UFRG, 2006).

Um dos subprodutos do processamento da soja, o farelo, é obtido a partir da moagem dos grãos de soja, para extração do óleo. Possui grande importância no mercado agropecuário brasileiro e mundial como ração animal e complemento alimentar humano, conforme salientado por TEIXEIRA (2005).

O farelo de soja, conforme PARAÍSO (2001) representa 70% da massa sólida do grão de soja, sendo que 51% correspondem às proteínas, 43% aos carboidratos e 6% às cinzas. O conteúdo de proteína varia de acordo com o método de extração de óleo e processamento

A soja passa por várias fases até a obtenção do farelo de soja descritas por SARTORI (2001) e PARAÍSO (2001), que são: silagem, limpeza, secagem dos grãos, quebra dos grãos, cozimento, laminação, expansão, extração, dessolventização-tostagem, secagem do farelo de soja, peletização, moagem e expedição.

O farelo de soja é uma das fontes mais utilizadas de proteína vegetal. Amplamente disponível, é comercializado de forma ativa e seu perfil de aminoácidos é adequado às necessidades de ingestão de aminoácidos de muitos animais. Os aminoácidos presentes no farelo de soja são altamente digestíveis e complementam outros ingredientes para a obtenção de uma dieta balanceada. O farelo de soja é usado como fonte de aminoácidos para muitos animais, em todas as fases de vida (ADM, 2006; SILVA, 1995).

3.9.8 Melaço de Soja

O melaço de soja é o resíduo gerado pelo processo de obtenção do extrato protéico de soja.

Este processo visa extrair as proteínas da soja com o uso de uma mistura etanol e água. Esta mistura insolubiliza as proteínas e fibras da soja,

que são retiradas; após secagem obtêm-se um produto conhecido como proteína concentrada de soja. A fração líquida da mistura etanol e água contém na sua maior parte, os açúcares da soja que, após a recuperação do etanol por evaporação, acabam por gerar o melaço de soja (UFRG, 2006).

O melaço de soja é um resíduo complexo que possui carboidratos de peso molecular elevado, além de carboidratos ligados a outras moléculas, como mostra a Tabela 9:

TABELA 9. Análises Químicas e Cromatográficas do Melaço ou Melaço de Soja da empresa IMCOPA em diferentes °Brix:

	MELAÇO 10°Brix	MELAÇO 40°Brix	MELAÇO 80°Brix
pH	5,9	5,9	5,8
Sólidos Solúveis (%)	12,11	43,19	87,35
Sólidos Insolúveis (%)	0,49	3,06	1,16
Sólidos Totais (%)	12,60	46,25	88,51
Cinzas (%)	2,46	9,67	17,63
Proteína Total (%)	1,00	3,49	4,81
Lipídeos (%)	3,77	8,83	10,45
Açúcares Redutores (%)	2,20	5,95	3,10
Carboidratos Totais (CT-FAS %)	7,93	31,06	55,30
Carboidratos Totais (CT-DNS %)	5,60	23,65	38,40
Glicose (%)	0,17	1,16	1,14
Frutose (%)	0,63	0,47	1,16
Galactose (%)	1,10	4,98	6,80
Lactose (%)	-	-	-
Sacarose (%)	0,48	7,02	10,90
Rafinose (%)	1,04	5,15	8,73
Estaquiiose (%)	1,95	9,20	13,62
Carboidratos Totais Cromatografia (%)	5,37	27,98	42,35

FONTE: UFSCar – RELATÓRIO TÉCNICO, 2004.

Dependendo do processo de extração de proteínas, esses teores podem variar.

Devido a esses altos teores de carboidratos, existem estudos sobre a utilização de melaço de soja em processos biotecnológicos como, por exemplo, na produção de etanol (MACHADO, 1999).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná.

4.1 Microrganismos

Quatro das cinco cepas de *Xanthomonas campestris* testadas neste trabalho foram adquiridas do banco de cepas Centro de Culturas Tropicais (CCT) André Tosello, em Campinas, SP. A quinta cepa, LPB01, disponível no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, foi cedida pelo Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Indústria Química – INTEC, de Santa Fé, Argentina. A tabela 10 mostra o código de linhagem das bactérias utilizadas:

TABELA 10. Códigos das cepas de bactérias testadas:

CÓDIGO	DESCRIÇÃO DA CEPA
CCT 5677	<i>Xanthomonas campestris</i>
CCT 6510	<i>Xanthomonas campestris</i>
CCT 6507	<i>Xanthomonas campestris</i>
CCT 6508	<i>Xanthomonas campestris</i>
LPB01	<i>Xanthomonas campestris</i>

4.2 Conservação das Cepas

As cepas de *Xanthomonas campestris* utilizadas neste estudo foram mantidas em tubos inclinados contendo meio de crescimento especificado na tabela 11, que apresenta também o meio básico sugerido de produção de goma xantana de acordo com metodologia já otimizada por WOICIECHOWSKI (2001).

Para o preparo do meio solidificado, os componentes do meio, incluindo o ágar, foram diluídos em água destilada, o pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1N, e distribuído em tubos ao volume de 10 mL por tubo,

fechados com algodão e autoclavados a 121°C, durante 15 minutos. Após a esterilização os tubos contendo o meio de crescimento foram colocados em posição inclinada para a solidificação do meio. Depois de inoculados com as cepas de *Xanthomonas campestris*, os tubos foram incubados por 48 horas em estufa a 28°C. Após este período, os tubos foram conservados em geladeira a $\pm 4^\circ\text{C}$. Repiques eram feitos para o mesmo meio a cada 30 dias a fim de se manter a viabilidade celular.

TABELA 11. Meios básicos de crescimento (manutenção da cepa) e de produção usados para a *Xanthomonas campestris*

Componente	Meio de Crescimento	Meio de Produção
Glicose (g/L)	10	20
Extrato de Levedura (g/L)	5	10
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0,1	0,1
CaCO ₃ (g/L)	10	-
Ágar (%) – manutenção	17	-

FONTE: WOICIECHOWSKI, 2001.

4.3 Preparo do Inóculo

Para o preparo do meio líquido, adaptou-se a metodologia já otimizada por WOICIECHOWSKI (2001), onde os componentes do meio de crescimento da tabela 11, excluindo-se o ágar, foram diluídos em água destilada, ajustou-se o pH para 7,0 com solução de NaOH 1N, e distribuído em erlenmeyers de 125 mL, à razão de 25 mL por erlenmeyer, fechados com tampão de algodão e autoclavados a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, transferiu-se assepticamente com auxílio de alça de platina, uma alçada da cultura crescida sobre o meio de manutenção para o erlenmeyer com o meio líquido de crescimento. Incubou-se o frasco em agitador orbital na rotação de 120 rpm, na temperatura de 30°C, por 36 horas. O inóculo assim preparado foi utilizado como suspensão semente para os testes do estudo.

4.4 Substratos

Os resíduos e subprodutos utilizados no preparo dos substratos hidrolisados e como suporte nos testes fermentativos são mostrados nas Figuras 5 e 6.



FIGURA 5. Resíduos e subprodutos agroindustriais utilizados, na granulometria de 0,8-2,0mm: Bagaçõ de Cana-de-Açúcar, Bagaçõ de Mandioca, Polpa Cítrica, Farelo de Soja.

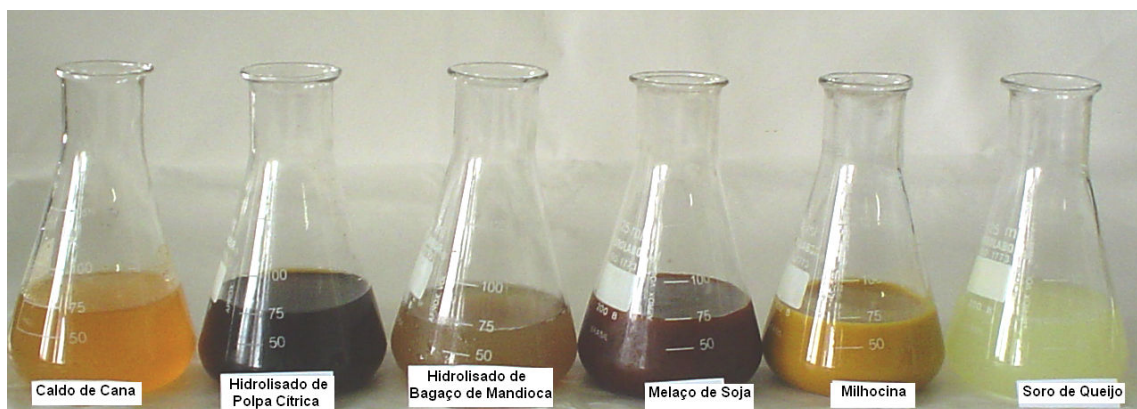


FIGURA 6. Hidrolisados, resíduos e subprodutos industriais utilizados: Caldo de Cana-de-Açúcar, Hidrolisado de Polpa Cítrica, Hidrolisado de Bagaçõ de Mandioca, Melaço de Soja, Água de Maceração do milho (Milhocina®), Soro de Queijo.

4.4.1 Preparo do Bagaço de Cana-de-Açúcar:

O bagaço de cana (BC) recebido em caixas no laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná foi fornecido pela usina Dasa – Destilaria Americana S/A, com sede em Nova América da Colina, PR.

O bagaço foi moído em moinho elétrico e classificado em peneiras de acordo com sua granulometria: fração grossa (maior do que 2,0 mm - reprocessada), fração média (entre 0,8 e 2,0 mm – utilizada como suporte na FES), fração fina (menor que 0,8 mm – descartada). Após, a fração média do bagaço, foi submetida a lavagens sucessivas em água corrente para a retirada de açúcares. O bagaço lavado foi seco em estufa de com circulação de ar a 80°C. Medidas freqüentes de umidade eram feitas até que se atingisse uma umidade de 3%. Após atingir-se essa umidade o bagaço foi embalado e vedado em saco de polietileno a fim de se conservar essa umidade.

4.4.1.2 Determinação da Umidade no Bagaço de Cana-de-Açúcar

Com o objetivo de utilizar o bagaço de cana como suporte para a FES determinou-se sua umidade no equipamento Balança Determinadora de Umidade por Infravermelho, Top Ray Infrared Moisture Balance.

4.4.2 Preparo do Farelo de Soja

O farelo de soja (FS) recebido em sacas no laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná foi fornecido pela empresa Cargill Agrícola S/A, localizada em São Paulo, SP.

O farelo de soja foi moído em moinho elétrico e classificado em peneiras de acordo com a sua granulometria: fração grossa (maior do que 2,0 mm - reprocessada), fração média (entre 0,8 e 2,0 mm – utilizada como suporte na FES), fração fina (menor que 0,8 mm – descartada). Após, o farelo foi seco em estufa de bandeja com circulação de ar a 80°C. Medidas freqüentes de umidade eram feitas até que se atingisse uma umidade de 3%. Após atingir-se essa umidade o farelo foi embalado e vedado em saco de polietileno a fim de se conservar essa umidade.

4.4.2.1 Determinação da Umidade no Farelo de Soja

Conforme item 4.4.1.2.

4.4.3 Preparo do Bagaço de Mandioca

O bagaço de mandioca (BM) recebido em sacas no laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná foi fornecido pela empresa Agroindustrial Paranaense de Polvilho Ltda., localizada em Paranavaí, PR.

O bagaço foi moído em moinho elétrico e classificado em peneiras de acordo com a sua granulometria: fração grossa (maior do que 2,0 mm - reprocessada), fração média (entre 0,8 e 2,0 mm – utilizada como suporte na FES e preparo do hidrolisado), fração fina (menor que 0,8 mm – descartada). O bagaço na fração média foi seco em estufa de bandeja com circulação de ar a 80°C. Medidas freqüentes de umidade eram feitas até que se atingisse uma umidade de 3%. Após atingir-se essa umidade o bagaço foi embalado e vedado em saco de polietileno a fim de se conservar essa umidade.

4.4.3.1 Determinação da Umidade no Bagaço de Mandioca

Conforme item 4.4.1.2.

4.4.3.2 Hidrólise ácida do Bagaço de Mandioca

A hidrólise ácido-térmica do bagaço de mandioca, foi feita em frasco erlenmeyer de 500 mL, utilizando-se uma concentração de 100 g de bagaço de mandioca por litro de fase líquida (água). Em seguida, ajustou-se o pH em torno de 2,0-2,5 com HCl concentrado. Fechou-se o frasco com tampão de algodão e autoclavou-se para fazer o tratamento térmico por 15 minutos a 121°C. Após este período deixou-se resfriar. Em seguida, neutralizou-se com solução de NaOH 6N até pH 7,0-7,14 e filtrou-se em filtro de nylon. A Figura 7 mostra o aspecto do hidrolisado e do bagaço de mandioca não processado.



FIGURA 7. Bagaço e hidrolisado ácido de Bagaço de Mandioca

4.4.4 Preparo da Polpa Cítrica:

A polpa cítrica (PC) utilizada neste estudo foi cedida pela empresa Cargill Agrícola S/A, localizada em São Paulo, SP estando peletizada e seca.

A PC foi previamente triturada em moinho elétrico e classificada em peneiras de acordo com a sua granulometria: fração grossa (maior do que 2,0 mm - reprocessada), fração média (entre 0,8 e 2,0 mm – utilizada como suporte na FES e preparo do hidrolisado), fração fina (menor que 0,8 mm – descartada). A PC foi seca em estufa de bandeja com circulação de ar a 80°C. Medidas freqüentes de umidade eram feitas até que se atingisse uma umidade de 3%. Após atingir-se essa umidade a PC foi embalada e vedada em saco de polietileno a fim de se conservar essa umidade.

4.4.4.1 Determinação da Umidade na Polpa Cítrica

Conforme item 4.4.1.2.

4.4.4.2 Hidrólise ácida da Polpa Cítrica

A hidrólise ácido-térmica da PC, com o objetivo de hidrolisar os açúcares poliméricos ainda presentes, foi feita em frasco erlenmeyer de 500 mL, utilizando-se uma concentração de 100 g de PC por litro de fase líquida (água). Em seguida, ajustou-se o pH em torno de 2,0-2,5 com HCl concentrado. Fechou-se o frasco com tampão de algodão e autoclavou-se para fazer o tratamento térmico por 15 minutos em 121°C. Após este período deixou-se resfriar. Em seguida neutralizou-se com solução de NaOH 6N até pH 7,0-7,14 e filtrou-se em filtro de nylon. A figura 8 mostra o aspecto da polpa cítrica peletizada e de seu hidrolisado.



FIGURA 8. Polpa Cítrica peletizada e hidrolisado ácido de Polpa Cítrica

4.4.5 Preparo do Melaço de Soja

O melaço de soja utilizado neste estudo foi cedido pela empresa IMCOPA – Importadora, Exportadora e Indústria de Óleos Ltda., localizada em Araucária, PR. O melaço chegou em tambores, estando numa concentração de

açúcares de 80°Brix. Diluições foram feitas a fim de padronizar a concentração de açúcares redutores totais ideais para seu uso nas fermentações.

4.4.6 Preparo do Soro de Queijo

O soro de queijo utilizado neste estudo foi cedido pela Indústria de Laticínios Frimesa Ltda., localizada em Curitiba, PR. O soro foi recolhido na empresa em garrações plásticas. Diluições foram feitas a fim de padronizar a concentração de açúcares redutores totais ideais para seu uso nas fermentações.

4.4.7 Preparo do Caldo de Cana-de-Açúcar

O caldo de cana utilizado neste trabalho foi coletado em um único ponto de venda de caldo de cana-de-açúcar na cidade de Curitiba, na quantidade suficiente para a realização de todo o trabalho. Diluições foram feitas a fim de padronizar a concentração de açúcares redutores totais ideais para seu uso nas fermentações.

4.4.8 Preparo da Água de Maceração do Milho

A água de maceração do milho utilizada neste trabalho foi fornecida sob o nome de Milhocina® pela empresa Corn Products Brasil Ingredientes Industriais Ltda., localizada em Balsa Nova, PR. Diluições foram feitas a fim de padronizar a concentração de açúcares redutores totais ideais para seu uso nas fermentações.

4.5 Caracterização Físico-Química dos substratos: Hidrolisado de Bagaço de Mandioca, Hidrolisado de Polpa Cítrica, Melaço de Soja, Soro de Queijo, Caldo de Cana e Água de Maceração do Milho (Milhocina®).

4.5.1 pH

O pH foi determinado utilizando-se um potenciômetro devidamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

4.5.2 Açúcar Redutor Total

Os materiais que apresentavam na sua composição açúcares não-redutores (Melaço de Soja, Soro de Queijo, Caldo de Cana e Água de Maceração do Milho) foram submetidos a um tratamento ácido-térmico, com a finalidade de hidrolisar estes açúcares, os quais puderam ser quantificados pela metodologia escolhida. O tratamento ácido-térmico compreende as seguintes etapas: Pesar 1 a 2 gramas da amostra e passá-la para um frasco volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 50 mL de água, 2 mL de ácido clorídrico e levar ao aquecimento em banho-maria durante 20 minutos. Esfriar e neutralizar com solução de hidróxido de sódio a 40%, com auxílio de pHmetrô. Completar o volume com água destilada e filtrar. Foi determinada no sobrenadante a concentração de açúcares redutores totais pelo método colorimétrico de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945).

Esta metodologia é fundamentada na ação da glicose reduzindo o reativo alcalino de óxido cuproso. Este em presença do reativo arseno-molibdato de sódio (reagente Nelson) forma um complexo azul estável de óxido de molibdênio, cuja concentração é medida por fotolorimetria em comprimento de onda de 535 nm.

4.6 As Fermentações

Os testes fermentativos foram divididos em etapas que visavam à otimização do processo. Foram realizados os seguintes testes fermentativos em duplicata:

4.6.1 ESTUDO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.6.1.1 Teste para a Seleção de Cepa

A primeira etapa dos testes fermentativos teve como objetivo a seleção da melhor cepa produtora de xantana por fermentação submersa.

Os testes foram feitos utilizando-se os seis substratos líquidos que são: hidrolisados de bagaço de mandioca (HBM) e polpa cítrica (HPC), melaço de soja (MSoja), soro de queijo (SQueijo), caldo de cana (CCana) e água de maceração do milho (Milhocina®). Os testes de seleção de cepa por fermentação submersa, não utilizaram nenhuma suplementação a mais, a não ser para o hidrolisado de bagaço de mandioca, onde se adicionou ao meio 10 g/L de extrato de levedura. Antes do preparo dos meios para a fermentação, todos os substratos foram diluídos para se ter uma concentração de açúcar redutor padronizada a 20 g/L. O pH foi ajustado para 7,0 com solução NaOH 1N com auxílio do potenciômetro. Os substratos foram distribuídos em frascos erlenmeyers de 250 mL na proporção de 50 mL/erlenmeyer, fechados com algodão e esterilizados em autoclave na temperatura de 121°C por 15 minutos.

Após, os frascos foram inoculados em câmara de fluxo laminar, numa taxa de 4% de inóculo (2 mL) em relação ao meio líquido, e colocados em incubador-agitador de movimento orbital na temperatura de 28-30°C a 120 rpm durante 96 horas, conforme metodologia otimizada por WOICIECHOWSKI (2001).

A solução de inóculo era preparada e utilizada com uma concentração de $2 \cdot 10^7$ células viáveis por mL. A contagem de células foi feita pela técnica de semeadura em profundidade (*pour-plate*).

A Figura 9 mostra o modelo do agitador orbital utilizado. Agitador marca Tecnal, modelo TE420, de fabricação nacional, com temperatura e agitação ajustáveis.



FIGURA 9. Agitador de movimento orbital utilizado nas fermentações submersas

4.6.2 ESTUDO EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

4.6.2.1 FES utilizando o Bagaço de Cana como suporte e variando soluções impregnantes usadas como substrato.

Após a seleção da melhor cepa produtora de goma xantana partiu-se para a segunda etapa, onde os cinco melhores substratos foram usados como solução impregnante no bagaço de cana para a FES, que foram: hidrolisados de bagaço de mandioca e polpa cítrica, melaço de soja, caldo de cana e água de maceração do milho, sem nenhuma suplementação, onde apenas para o hidrolisado de bagaço de mandioca, se adicionou ao hidrolisado 10 g/L de extrato de levedura. Devido à baixa produção de goma xantana obtida anteriormente em meio utilizando soro de queijo, o mesmo não foi utilizado neste experimento.

Cada substrato foi impregnado em concentrações diferentes de açúcar redutor total, de acordo com a sua disponibilidade.

Três gramas do bagaço de cana (suporte) foram misturados com cada substrato diluído adequadamente em diversas concentrações, colocado em

frascos Erlenmeyer de 250 mL e fechados com tampão de algodão. Cada substrato foi adicionado de modo a obter uma umidade inicial em torno de 85%, sendo essa a capacidade máxima de absorção do bagaço de cana, ajustando-se o pH a 7, 0, para posteriormente serem esterilizados a 121°C por 15 minutos. Em seguida, os frascos foram inoculados em câmara de fluxo laminar, numa taxa de 10% de inóculo (10^7 células viáveis por mL) em relação ao meio líquido (substrato), já otimizado em experimentos no Laboratório de Processos Bioetecnológicos. Os frascos foram incubados câmara de vapor saturado à temperatura de 28°C durante 7 dias.

As concentrações utilizadas de cada substrato como solução impregnante no suporte bagaço de cana, foram:

- Hidrolisado de Bagaço de Mandioca: 10 e 16 g/L de ART.
- Hidrolisado de Polpa Cítrica: 10,15 e 20 g/L de ART.
- Melaço de Soja: 25, 35, 45, 55, 65 g/L de ART.
- Caldo de Cana: 25, 35, 45, 55, 65 g/L de ART.
- Milhocina®: 25, 35, 45, 55, 65 g/L de ART.

4.6.2.2 FES utilizando combinações de substratos:

Nesta etapa, o resíduo sólido que produziu os melhores hidrolisados usados como soluções impregnantes, foram utilizados em sua forma *in natura* (sólida) como suporte/substrato para a FES, utilizando-se solução salina como solução impregnante, em umidade fixada como 85%, de acordo com a capacidade de absorção de cada um. Os melhores resultados foram obtidos com hidrolisado de polpa cítrica, hidrolisado de bagaço de mandioca e solução de melaço de soja, assim para a FES utilizou-se como suporte/substrato, polpa cítrica, farelo de soja e bagaço de mandioca, na granulometria de 0,8-2,0 mm.

A Tabela 12 mostra as combinações feitas a fim de se selecionar o melhor suporte:

TABELA 12. Combinações realizadas com os substratos para a FES

Fermentação	Componente	Proporção (%)
1	PC <i>in natura</i>	100
2	FS <i>in natura</i>	100
3	BM <i>in natura</i>	100
4	PC <i>in natura</i> / BC	50 / 50
5	FS <i>in natura</i> / BC	50 / 50
6	BM <i>in natura</i> / BC	50 / 50

O bagaço de mandioca, o farelo de soja e a polpa cítrica puros e/ou combinados com o bagaço de cana (suporte inerte), foram misturados com solução salina em frascos Ernlennmeyer de 250 mL e fechados com tampão de algodão. A solução salina foi adicionada de modo a obter uma umidade inicial em torno de 85%, ajustando-se o pH a 7,0, para posteriormente serem esterilizados a 121°C por 15 minutos. Em seguida, os frascos foram inoculados em câmara de fluxo laminar, numa taxa de 10% de inóculo em relação ao meio líquido (substrato). Os frascos foram incubados câmara de vapor saturado à temperatura de 28°C durante 7 dias. Somente nos frascos contendo bagaço de mandioca puro ou com bagaço de cana, utilizou-se solução salina contendo extrato de levedura na concentração de 10 g/L.

A solução salina tinha a seguinte composição, já otimizada por WOICIECHOWSKI (2001): Extrato de Levedura, 10 g/L (quando necessário); KH₂PO₄, 0,01g/L; água q.s.p. 1000 mL.

4.6.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA FES

Este estudo teve como objetivo comparar os dois melhores substratos testados individualmente (Farelo de Soja e Bagaço de Mandioca) em diferentes proporções com o bagaço de cana, variando-se também a taxa de inóculo.

4.6.3.1 Influência da proporção entre Farelo de Soja *in natura* / Bagaço de Cana e taxa de inóculo

Para o estudo da influência da taxa de inóculo e da proporção entre farelo de soja (substrato) e bagaço de cana (suporte) na produção de goma xantana, foi utilizado um delineamento fatorial 3^2 completo para estudar o efeito destas variáveis independentes. Este delineamento é composto de nove ensaios, 3 níveis e 2 fatores experimentais sendo 1 bloco. As taxas de inóculo e as proporções de FS e BC testadas são mostradas na Tabela 13.

TABELA 13. Planejamento Experimental para avaliar a influência da taxa de inóculo e proporções de FS/BC na produção de goma xantana.

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3^2 COMPLETO			
FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Taxa de Inóculo (%)	5	10	15
Proporção FSoja (%)	30	60	90

A análise dos dados foi feita por superfície de resposta através do programa *Statistic* para Windows 5.0 versão estudantil.

Cada experimento foi realizado em duplicata.

O farelo de soja, bagaço de cana e a solução salina foram misturados em frascos Ernlmeyer de 250 mL e fechados com tampão de algodão. A salina foi adicionada de modo a obter uma umidade inicial em torno de 85%, ajustando-se o pH a 7,0, para posteriormente serem esterilizados a 121°C por 15 minutos. Em seguida, os frascos foram inoculados em câmara de fluxo laminar, nas taxas a serem testadas. Os frascos foram incubados em câmara de vapor saturado à temperatura de 28°C durante 7 dias.

4.6.3.2 Influência da proporção entre Bagaço de Mandioca *in natura* / Bagaço de Cana e taxa de inóculo

Para o estudo da influência da taxa de inóculo e da proporção entre bagaço de mandioca (substrato) e bagaço de cana (suporte) na produção de goma xantana, foi utilizado um delineamento fatorial 3^2 completo para estudar o

efeito destas variáveis independentes. Este delineamento é composto de nove ensaios, 3 níveis e 2 fatores experimentais sendo 1 bloco. As taxas de inóculo e as proporções de BM e BC estudadas são mostradas na Tabela 14.

TABELA 14. Planejamento Experimental para avaliar a Influência da taxa de inóculo e proporções de BM/BC na produção de goma xantana.

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3 ² COMPLETO			
FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Taxa de Inóculo (%)	5	10	15
Proporção BMand (%)	30	60	90

A análise dos dados foi feita por superfície de resposta através do programa *Statistic* para Windows 5.0 versão estudantil.

Cada experimento foi realizado em duplicata.

O bagaço de mandioca, o bagaço de cana e a solução salina contendo 10 g/L de extrato de levedura, foram misturados em frascos Ernlennmeyer de 250 mL e fechados com tampão de algodão. A solução salina foi adicionada de modo a obter uma umidade inicial em torno de 85%, ajustando-se o pH a 7,0, para posteriormente serem esterilizados a 121°C por 15 minutos. Em seguida, os frascos foram inoculados em câmara de fluxo laminar, nas taxas a serem testadas. Os frascos foram incubados em câmara de vapor saturado à temperatura de 28°C durante 7 dias.

4.6.4 Estudo Cinético do Tempo de Produção da goma xantana por FES usando Bagaço de Mandioca *in natura* e Bagaço de Cana

Este estudo foi realizado em condições já otimizadas, de acordo com o item 4.6.3.2., após a seleção do Bagaço de Mandioca demonstrar resultado superior ao Farelo de Soja.

As fermentações ocorreram por 7 dias em duplicata, sendo que se retiraram dois frascos por dia para as análises.

4.6.5 Estudo com diferentes umidades nas condições otimizadas para FES em frascos

Este estudo foi feito com o objetivo de se pesquisar um teor de umidade que não produzisse compactação de meio o que prejudica a difusão através do leito. Este fato foi verificado no teste realizado com as colunas de Raimbault, onde a umidade de 85% demonstrou ser incompatível. As umidades testadas foram 70, 75 e 80% de umidade em condições já otimizadas de acordo com o item 4.6.3.2 (BM90%/BC10%) e a taxa de inóculo continuou sendo de 10%, também otimizado anteriormente.

4.6.6 Teste em colunas de Raimbault para FES

Este experimento teve como objetivo, testar a influência da aeração na condição de umidade obtida no item 4.6.5 na produção da xantana. Para isto, testaram-se três vazões de ar diferentes: 20, 40 e 60 mL/min, que propicia respectivamente aeração de 2, 4 e 6 mL/min.g de matéria seca, totalizando 3 experimentos, realizados em duplicata.

As colunas de vidro, bem como os borbulhadores de ar foram devidamente esterilizados a 121°C por 15 minutos. Cada coluna foi preenchida com 10 gramas de matéria seca (BM / BC) mais a solução salina de modo a obter-se a umidade selecionada no experimento anterior, sendo esterilizado separadamente em frascos Erlenmeyer de 250 mL. A inoculação na taxa de 10% foi realizada no próprio frasco e após homogeneização, as colunas foram preenchidas assepticamente em câmara de fluxo laminar. Cada coluna foi pesada antes e após preenchimento com o substrato.

Após preenchimento com o substrato, as colunas foram conectadas em borbulhadores de ar de 250 mL, contendo aproximadamente 150 mL de água destilada, para umedecer o ar antes de sua passagem pelas colunas. As colunas foram colocadas em cuba de vidro contendo água na temperatura de 28°C, mantida com auxílio de aquecedor e controlada por um termostato. Cada coluna foi conectada a uma válvula que permitiu ajustar a vazão de ar aos valores a serem testados. A Figura 10 mostra as fermentações sendo realizadas nas colunas de Raimbault.

FIGURA 10. Fermentações realizadas em Colunas de Raimbault.



4.7 Análises Realizadas nos Fermentados

4.7.1 ANÁLISES REALIZADAS NOS FERMENTADOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.7.1.1 Biomassa

Após o tempo definido de fermentação, a biomassa produzida foi determinada gravimetricamente através da massa seca. Um volume definido de fermentado foi centrifugado em tubos previamente pesados, a 10.000 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada marca Hitachi, modelo Himac CR 21E, a uma temperatura de 20°C. O sobrenadante foi utilizado para a análise de goma xantana. A biomassa separada foi ressuspensa com 20 mL de água destilada, novamente centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa centrifugada foi seca em estufa a 80°C por 24 horas, resfriada em dessecador e pesada.

4.7.1.2 Goma Xantana

A goma xantana produzida durante a fermentação que se encontrava solúvel no meio fermentado, foi determinada gravimetricamente através do peso seco após precipitação com 3 volumes de álcool etílico. A goma xantana precipitada foi centrifugada em tubo previamente seco e pesado, a 10.000 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada marca Hitachi, modelo Himac CR 21E, a uma temperatura de 4°C. Esta baixa temperatura favorece a precipitação do polissacarídeo (WOICIECHOWSKI, 2001). O sobrenadante foi descartado e a goma xantana centrifugada foi seca em estufa a 80°C por 24 horas, resfriada em dessecador e pesada.

4.7.2 ANÁLISES REALIZADAS NOS FERMENTADOS OBTIDOS POR FES

4.7.2.1 Recuperação da Goma Xantana

A extração da goma foi realizada com 10 g de material fermentado, ao qual foi adicionado 100 mL de água (proporção 1:10). A mistura foi submetida à agitação por 20 minutos em agitador mecânico marca Ultra-Turrax, e então filtrada em filtro de nylon para eliminação de partículas sólidas grandes. A solução é novamente filtrada a vácuo com papel de filtro Whatman nº 1. O líquido foi diluído devido a alta viscosidade e centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada marca Hitachi, modelo Himac CR 21E, a uma temperatura de 20°C, para a eliminação de biomassa e outros sólidos ainda em suspensão. O precipitado foi descartado e a goma xantana solúvel foi recuperada do sobrenadante.

4.7.2.2 Quantificação da goma xantana produzida

A goma xantana solúvel no sobrenadante foi determinada gravimetricamente através do peso seco após precipitação com 3 volumes de álcool etílico. A goma xantana precipitada foi filtrada a vácuo em papel de filtro Whatman nº 1. A goma xantana retida no papel foi seca em estufa a 80°C por 24 horas, resfriada em dessecador e pesada.

4.7.2.3 pH

O pH final foi determinado no sobrenadante (extraído) obtido durante o processo de recuperação da goma xantana. Utilizou-se para isso um potenciômetro devidamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 na suspensão obtida após a extração da goma.

4.7.2.4 Umidade

Ao término da FES determinou-se a umidade do fermentado no equipamento Balança Determinadora de Umidade por Infravermelho, Top Ray Infrared Moisture Balance.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Físico-químicas realizadas nos Hidrolisados de Bagaço de Mandioca, Polpa Cítrica e nos subprodutos e resíduos Melaço de Soja, Soro de Queijo, Caldo de Cana e Água de Maceração do Milho (Milhocina®).

5.1.1 Açúcar Redutor e pH

As análises de açúcar redutor e pH foram realizadas de acordo com o item 4.5.1 e 4.5.2 com o objetivo de caracterizar cada subproduto/resíduo preparados de conforme o item 4.4 a fim de se proceder a adequação necessária para sua utilização na fermentação submersa e como substrato na FES.

De acordo com WOICIECHOWSKI (2001), o amido presente no bagaço de mandioca pode ser convertido em açúcar redutor (glicose), através da hidrólise deste material. O mesmo ocorre com a polpa cítrica, onde seus carboidratos também podem ser hidrolisados. A hidrólise pode ser feita submetendo-se o bagaço de mandioca e a polpa cítrica a um tratamento térmico por tempo definido em meio aquoso, com agente ácido ou alcalino. O resultado final é um xarope de glicose.

As determinações pelo método de Somogyi-Nelson foram feitas em triplicata e as médias dos resultados obtidos em g/L de açúcar redutor total (ART), aparecem na Tabela 15 que mostra também o resultado das análises de pH.

TABELA 15. Resultados de Açúcar Redutor Total (ART) e pH obtido nas análises realizadas nos subprodutos/resíduos utilizados antes das diluições

RESÍDUO	ART (g/L)	pH
Hidrolisado de Polpa Cítrica	22,64	6,9
Hidrolisado de Bagaço de Mandioca	24,35	7,1
Melaço de Soja	307,3	5,9
Milhocina®	123,54	4,2
Soro de Queijo	30,01	6,5
Caldo de Cana	223,9	6,7

5.2. Teste para Seleção de Cepa por Fermentação Submersa

O ensaio de fermentação submersa com os seis substratos padronizados a 20 g/L de ART, conforme indicado no item 4.6.1.1, foi feito por um período de 96 horas. As fermentações foram realizadas em duplicata. Para o ensaio com hidrolisado de bagaço de mandioca, adicionou-se ao meio 10 g/L de extrato de levedura, para adição de fonte de nitrogênio a este meio.

As Tabelas 16 e 17 mostram os resultados obtidos com as cepas testadas que tiveram produção significativa para a produção de goma xantana e biomassa em g/L.

TABELA 16. Produção de goma xantana em g/L com as cepas que tiveram produção significativa em cada substrato/resíduo

Substratos	Goma xantana produzida (g/L)					
	HBM	HPC	MSoja	SQueijo	CCana	Milhocina
Cepa CCT 5677	2,67	1,52	2,70	1,18	1,21	1,64
Cepa LPB01	14,12	11,76	13,55	2,03	4,28	12,85

TABELA 17. Produção de Biomassa em g/L com as cepas que tiveram produção significativa em cada substrato/resíduo

Substratos	Biomassa produzida (g/L)					
	HBM	HPC	MSoja	SQueijo	CCana	Milhocina
Cepa CCT 5677	1,19	0,98	1,24	0,79	0,75	0,87
Cepa LPB01	5,77	4,65	4,80	1,93	2,51	4,66

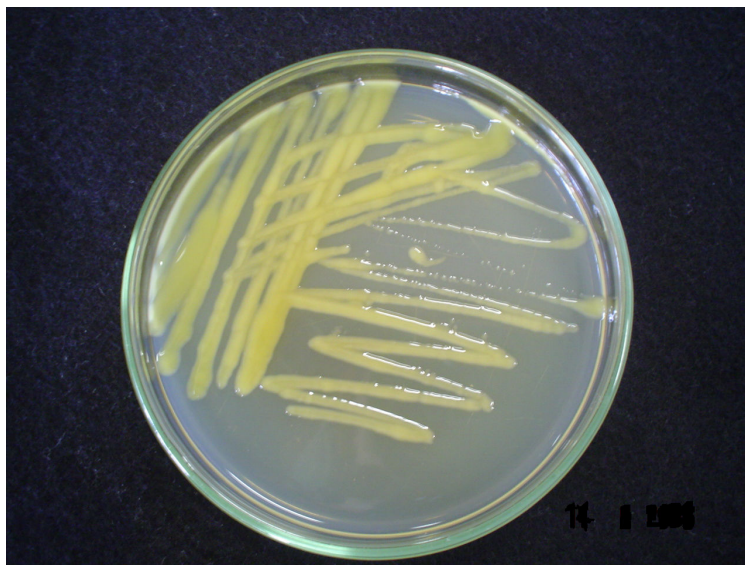
As cepas CCT 6510, CCT 6507 e CCT 6508 testadas não tiveram produção significativa de goma xantana. Ao final da fermentação não foi verificado um aumento de viscosidade nesses meios.

A cepa LPB01 demonstrou maior produção de biomassa e de polissacarídeo com todos os substratos, quando comparada à cepa CCT 5677, evidenciando sua capacidade superior em termos de produtividade.

Os resultados da produção do polissacarídeo por fermentação submersa foram satisfatórios, quando comparados a outros autores que também utilizaram resíduos da agroindústria. FARIA *et al.* (2005), conseguiu uma produção de 8,35 g/L de goma xantana, utilizando caldo de cana adicionado de sais, na concentração de 20g/L de sacarose. WOIEICHOWSKI (2001) obteve uma produção de 14 g/L de goma xantana utilizando hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com extrato de levedura.

Com base nos resultados obtidos nesta etapa, todos os ensaios fermentativos seguintes foram realizados com a cepa selecionada LPB01. A Figura 11 mostra o aspecto das colônias desta cepa.

FIGURA 11. Aspecto das colônias da cepa *Xanthomonas campestris* LPB01, crescida em ágar YM, 28°C ±2 por 48 horas.



5.3 ESTUDO EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

5.3.1 FES utilizando o Bagaço de Cana como suporte e variando soluções impregnantes usadas como substrato.

O ensaio de FES com os cinco substratos conforme indicado no item 4.6.2.1, foi feito por um período de 7 dias. As fermentações foram realizadas em duplicata. Para o ensaio com hidrolisado de bagaço de mandioca, foi adicionado ao hidrolisado 10 g/L de extrato de levedura, devido à falta de fonte de nitrogênio neste substrato.

O bagaço de cana foi impregnado com diferentes concentrações das soluções impregnantes: melação de soja, caldo de cana e Milhocina® (25, 35, 45, 55, 65 g/L de ART inicial, correspondendo aos valores 160,23 - 224,35 - 288,45 - 352,55 - 416,65 g/Kg de ART na base seca, respectivamente); hidrolisado de bagaço de mandioca (10 e 16 g/L de ART inicial, correspondendo aos valores 64,1 e 102,56 g/Kg de ART inicial na base seca) e hidrolisado de polpa cítrica (10, 15 e 20 g/L de ART inicial, correspondendo a 64,1 - 96,15 e 128,2 g/Kg de ART na base seca, respectivamente).

Os gráficos das Figuras 12, 13, 14 e 15 apresentam os resultados obtidos para a produção de goma xantana com cada solução impregnante (substrato) e em cada concentração utilizada.

FIGURA 12. Gráfico da produção de goma xantana em várias concentrações de ART para o caldo de cana impregnado em BC

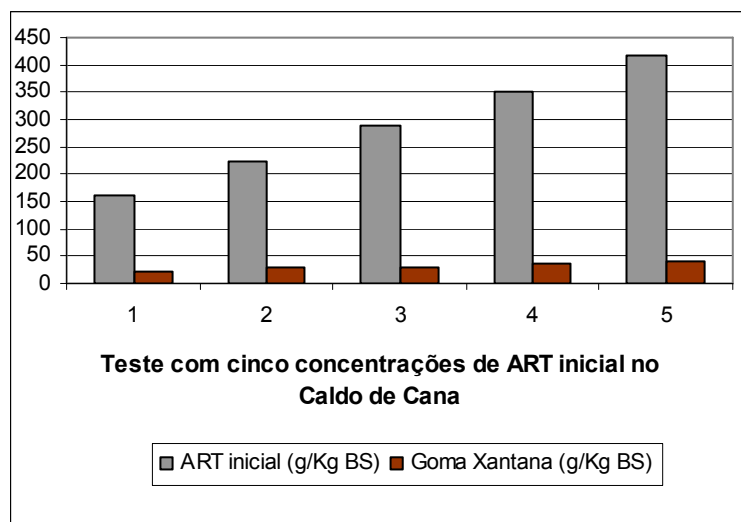


FIGURA 13. Gráfico da produção de goma xantana em várias concentrações de ART para o melão de soja impregnado em BC

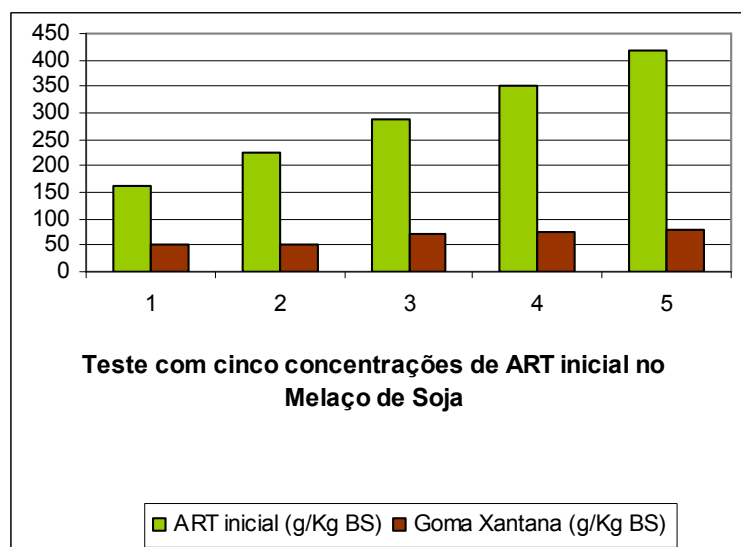


FIGURA 14. Gráfico da produção de goma xantana em várias concentrações de ART para o hidrolisado de polpa cítrica impregnado em BC

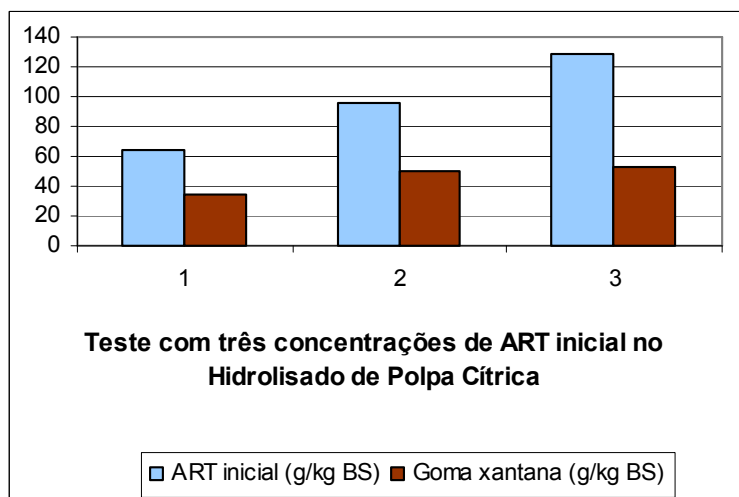
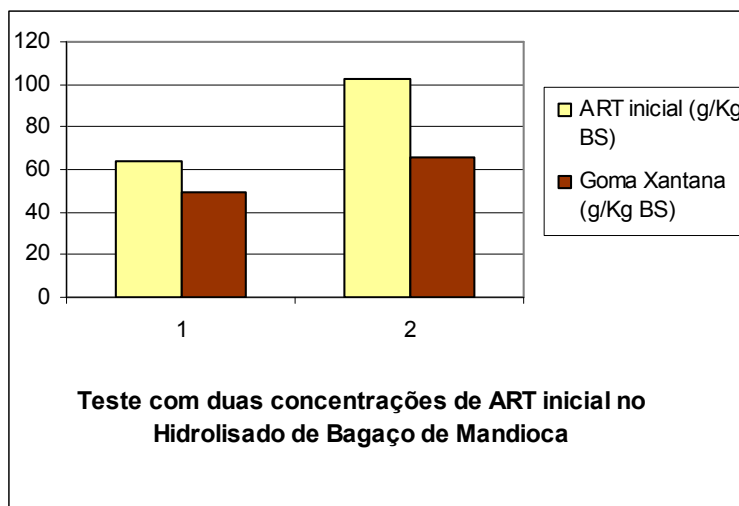


FIGURA 15. Gráfico da produção de goma xantana em várias concentrações de ART para o hidrolisado de bagaço de mandioca impregnado em BC



O uso do melaço de soja, dos hidrolisados de polpa cítrica e de bagaço de mandioca demonstraram resultados significativos para a produção da goma xantana, evidenciando que essa forma de produção pode ser explorada futuramente com intuito de otimização deste processo.

Nesta etapa dispensou-se o uso do soro de queijo devido à baixa produção goma pela bactéria utilizando este substrato. O principal problema encontrado na produção de xantana em soro de leite é a baixa capacidade de utilização de lactose por *X. campestris*, fato este que se deve à baixa afinidade da β -galactosidase da bactéria por lactose (FRANK & SOMKUTI, 1979).

A utilização da água de maceração do milho (Milhocina®) como substrato não produziu goma xantana, mesmo após a repetição da fermentação para confirmação, provavelmente devido aos nutrientes da Milhocina® não serem assimiláveis pela bactéria.

5.3.2 FES utilizando combinações de substratos

Nesta etapa, já selecionados os melhores substratos líquidos originados dos resíduos sólidos, os próprios resíduos foram utilizadas em sua forma *in natura* como suporte/substrato para a FES, conforme descrito no item 4.6.2.2. Foram selecionados os hidrolisados de polpa cítrica e de bagaço de mandioca e a solução de melaço de soja, por isso utilizou-se, polpa cítrica, farelo de soja e bagaço de mandioca, na granulometria de 0,8-2,0 mm. Para o ensaio utilizando bagaço de mandioca puro ou combinado com bagaço de cana, foi adicionada a solução salina 10 g/L de extrato de levedura, devido à falta de fonte de nitrogênio neste material.

As médias dos resultados obtidos para a produção de goma xantana com as combinações de substratos são demonstrados na Tabela 18.

TABELA 18. Produção de goma xantana utilizando diferentes combinações de substratos

Componente	Proporção (%)	Goma (g/Kg) base seca	pH final
PC <i>in natura</i>	100	NS	6,5
FS <i>in natura</i>	100	139,05	7,35
BM <i>in natura</i>	100	100,03	7,37
PC <i>in natura</i> / BC	50 / 50	65,42	5,33
FS <i>in natura</i> / BC	50 / 50	95,23	7,55
BM <i>in natura</i> / BC	50 / 50	104,81	5,51

NS: Produção de goma não significativa.

A utilização da polpa cítrica na proporção de 100%, ou seja, pura, não resultou em produção significativa de goma xantana, provavelmente devido à dificuldade de aeração do meio que se tornou muito compactado no decorrer do crescimento microbiano ou também por apresentar em sua composição algum elemento que interferisse nesse crescimento e na produção do polissacarídeo.

5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA FES

Com base nos experimentos anteriores, onde o bagaço de mandioca e o farelo de soja impregnados com solução salina demonstraram uma melhor produção de goma xantana, este estudo teve como objetivo comparar os dois melhores substratos testados individualmente em diferentes proporções com o bagaço de cana, variando-se também a taxa de inóculo, para deste estudo ser selecionado o melhor substrato para as fermentações seguintes.

5.4.1 Influência da proporção entre Farelo de Soja *in natura* / Bagaço de Cana e taxa de inóculo na produção de goma xantana por FES

O meio de fermentação foi preparado de acordo com o item 4.6.3.1, onde foram testadas diferentes proporções de farelo de soja em relação ao bagaço de cana e diferentes taxas de inoculação, fermentadas pelo período de 7 dias, após inoculação com a bactéria *Xanthomonas campestris*. Neste estudo foi utilizado um delineamento fatorial 3^2 completo para estudar o efeito destas variáveis independentes. Neste delineamento experimental foram testados dois fatores (% de Farelo de Soja e % de taxa de inóculo) em três níveis, com duas repetições, resultando em 9 condições experimentais. A variável dependente (variável resposta) é a produção de goma xantana (g/Kg matéria seca). A análise dos dados foi feita por superfície de resposta através do programa *Statistic* para Windows 5.0 versão estudantil.

A Tabela 19 apresenta o delineamento fatorial 3^2 completo para o estudo dos dois fatores experimentais na produção de goma xantana em g/Kg suporte/substrato na matéria seca.

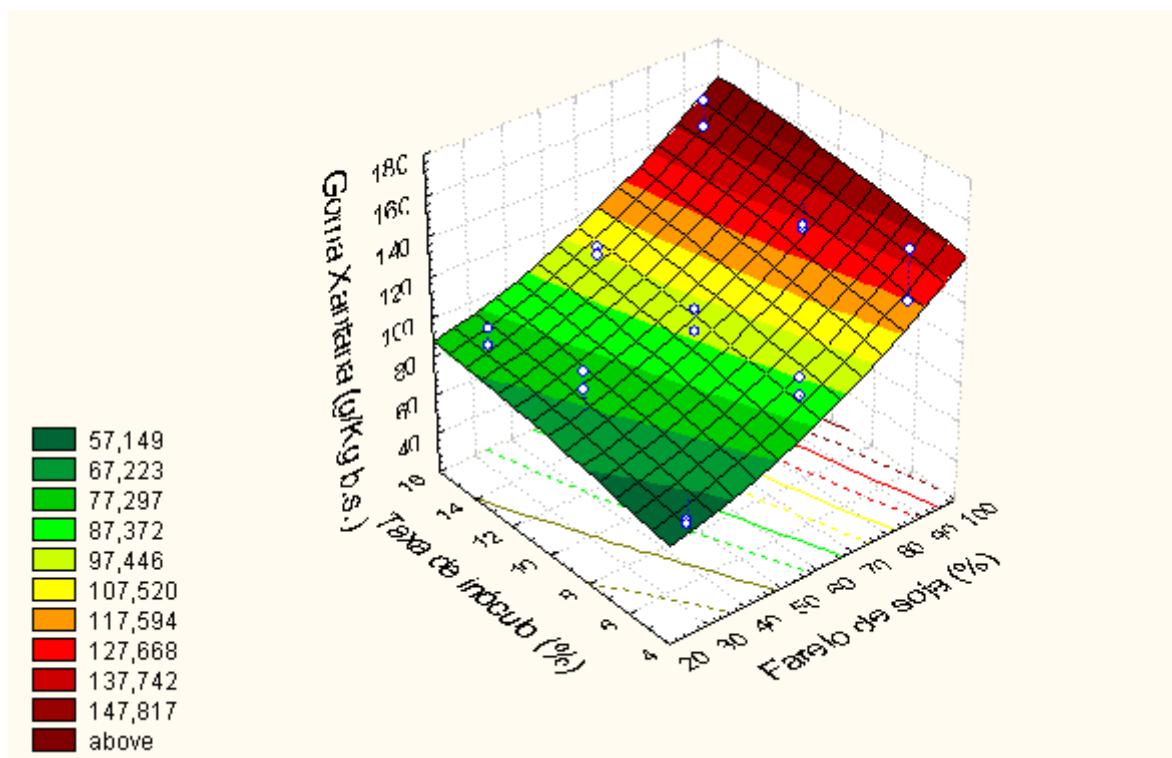
TABELA 19. Resultado da produção de goma xantana obtida para cada ensaio realizado do delineamento experimental 3^2 completo com Farelo de Soja / Bagaço de Cana

Ensaio	Variáveis Independentes		Variável Dependente
	FS (%)	Tx. Inóculo (%)	Goma Xantana (g/Kg ms)
1	90	15	150,185
2	60	15	94,105
3	30	15	70,270
4	90	10	118,530
5	60	10	89,80
6	30	10	83,92
7	90	5	126,315
8	60	5	90,635
9	30	5	41,765

NOTA: Média da produção de goma xantana \pm desvio padrão

A superfície de resposta apresentada no gráfico da Figura 16 mostra que quanto maior a proporção de farelo de soja em relação ao bagaço de cana, maior a produção da goma devido ao aumento da concentração de fonte de carbono, mas como já foi estudado anteriormente, o farelo de soja na proporção de 100%, ou seja, puro, diminuiu a produção da goma, fato observado devido a compactação do meio que dificulta a difusão de ar. Uma significativa melhora é notada quando há a adição do bagaço de cana, contribuindo para a melhoria da distribuição de ar. Mesmo com a diminuição da proporção do farelo de soja, essa pequena redução na concentração de fonte carbono não influenciou negativamente a produção. A % de inóculo em relação à solução impregnante (solução salina), neste caso, influenciou positivamente a produção da goma. As maiores produtividades foram conseguidas com uma taxa de 15% de inoculação.

FIGURA 16. Superfície de resposta para a produção de goma xantana mostrando os resultados da influência da % de taxa de inóculo e da proporção em % de FS em relação ao BC



A equação abaixo foi ajustada aos dados experimentais:

$$G. \text{ xantana (g/Kg b.seca)} = 28,2405 + 0,1747 (\% \text{ FS}) + 0,0078 (\% \text{FS})^2 + 3,3582 (\% \text{INOC.}) - 0,0748 (\% \text{INOC.})^2$$

Onde:

G. xantana = produção de goma xantana (g/Kg base seca)

%FS = proporção de farelo de soja

%INOC. = porcentagem de taxa de inóculo

A Tabela 20 mostra que o modelo ajustado aos dados experimentais para explicar a variação na produção de goma xantana para as variáveis testadas é significativo ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,84009$ e R^2 ajustado = $0,79088$ explica 79,08% da variação das respostas encontradas. O coeficiente de correlação encontrado é aceitável para este tipo de teste. Esta modelagem mostrou-se adequada, podendo ser utilizada para fins preditivos. O gráfico de pareto da Figura 17 mostra a

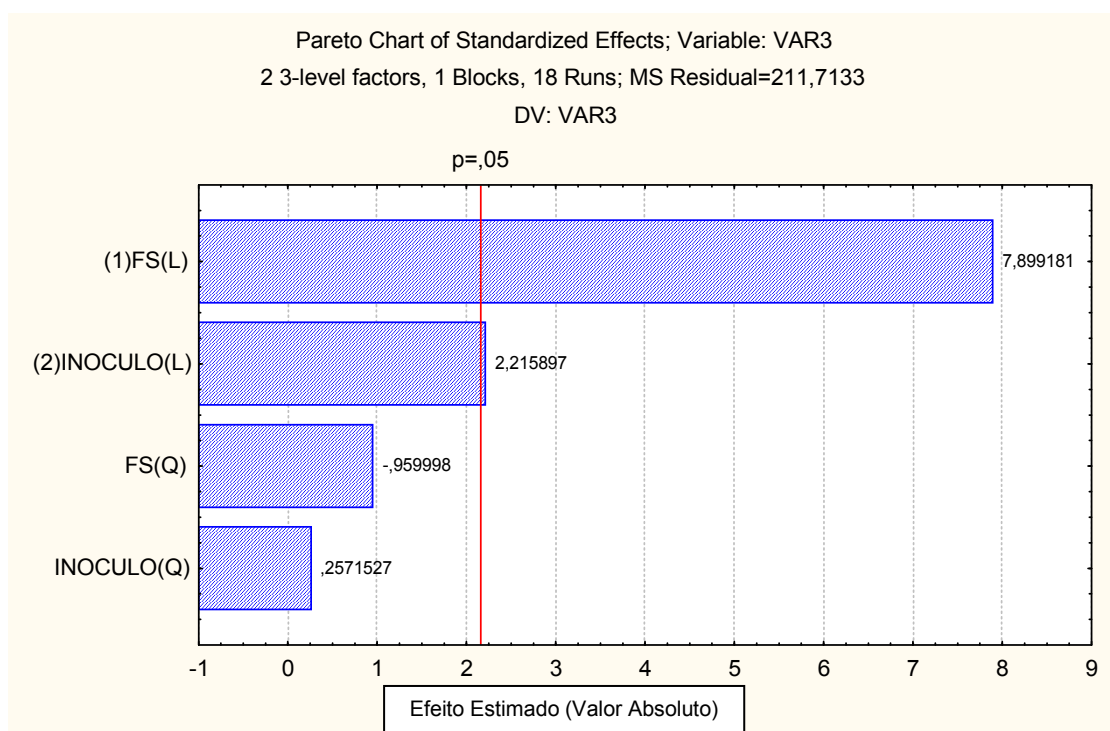
influência e os efeitos significativos das variáveis % de farelo de soja e % taxa de inoculação, indicando que no intervalo estudado, as variáveis testadas influenciaram a variável resposta (produção de goma xantana) ao nível de significância de 5%.

TABELA 20. Análise de variância para a variável resposta produção de goma xantana utilizando Farelo de Soja

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Proporção FS/BC (%) (L+Q)	13405,40*	2*	6702,700*	31,65933*	0,000010*
Taxa de Inoculação (%) (L+Q)	1053,55	2	526,777	2,48816	0,121640
Erro experimental	2752,27	13	211,713		
Total Soma Quadrados	17211,23	17			
R ²	0,84009				
R ² ajustado	0,79088				

NOTA: (*) estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade

FIGURA 17. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos da % de Farelo de Soja e da % da taxa de inoculação para o modelo de produção de goma xantana



5.4.2 Influência da proporção entre Bagaço de Mandioca *in natura* / Bagaço de Cana e taxa de inóculo na produção de goma xantana por FES

O meio de fermentação foi preparado de acordo com o item 4.6.3.2, onde foram testadas diferentes proporções de bagaço de mandioca em relação ao bagaço de cana e diferentes taxas de inoculação, fermentadas pelo período de 7 dias, após inoculação com a bactéria *Xanthomonas campestris*. Neste estudo foi utilizado um delineamento fatorial 3^2 completo para estudar o efeito destas variáveis independentes. Neste delineamento experimental foram testados dois fatores (% de Bagaço de Mandioca e % de taxa de inóculo) em três níveis, com duas repetições, resultando em 9 condições experimentais. A variável dependente (variável resposta) é a produção de goma xantana (g/Kg base seca). A análise dos dados foi feita por superfície de resposta através do programa *Statistic* para Windows 5.0 versão estudantil.

A Tabela 21 apresenta o delineamento fatorial 3^2 completo para o estudo dos dois fatores experimentais na produção de goma xantana em g/Kg suporte/substrato na base seca.

TABELA 21. Resultado da produção de goma xantana obtida para cada ensaio realizado do delineamento experimental 3^2 completo com Bagaço de Mandioca / Bagaço de Cana

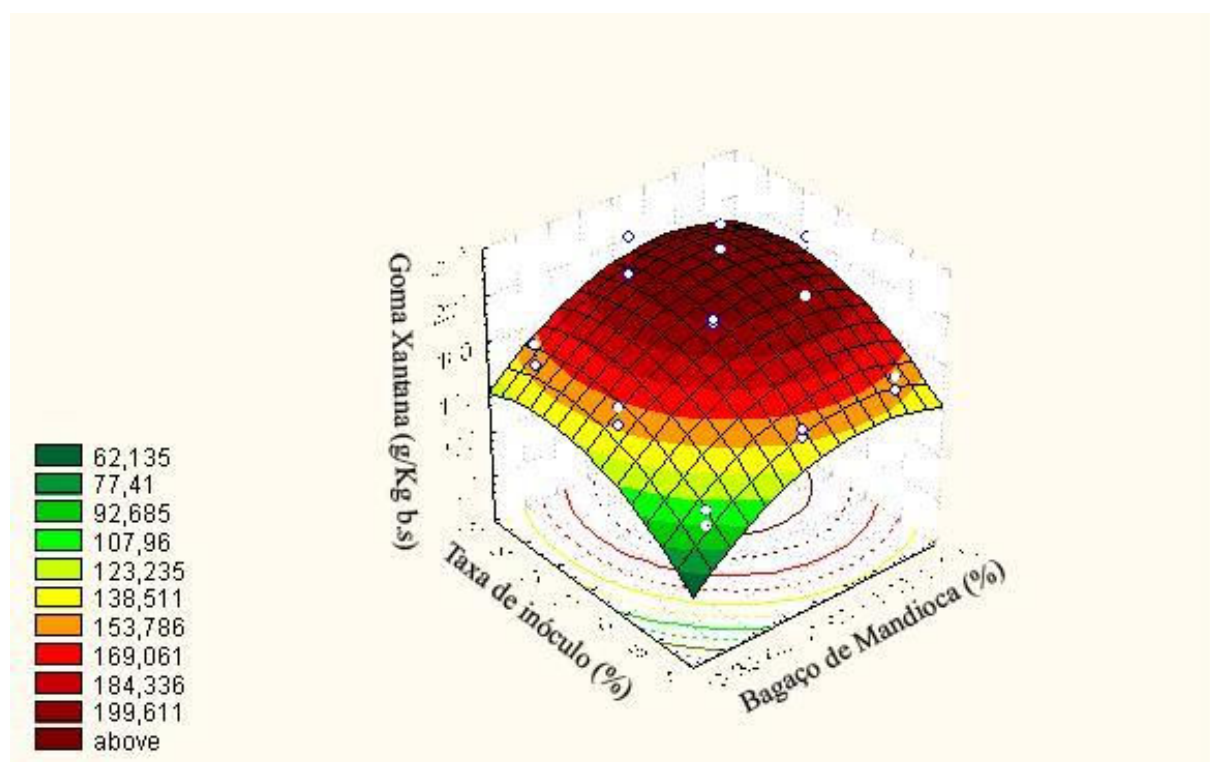
Exp.	Variáveis Independentes		Variável Dependente
	BM (%)	Tx. Inóculo (%)	Goma Xantana (g/Kg ms)
1	90	15	191,405
2	60	15	210,79
3	30	15	148,24
4	90	10	218,23
5	60	10	196,42
6	30	10	142,79
7	90	5	147,58
8	60	5	140,24
9	30	5	98,97

NOTA: Média da produção de goma xantana \pm desvio padrão

A superfície de resposta do gráfico da Figura 18 mostra que a utilização de BM na proporção de 90%, quando combinado com uma taxa de inoculação de 10%, gerou uma maior produção da goma. O gráfico de Pareto mostrado na

Figura 19 demonstrou que um aumento na taxa de inoculação contribui para um aumento na produção do polissacarídeo. Como já foi estudada anteriormente, a utilização do bagaço de mandioca na proporção de 100%, ou seja, puro, resultou na diminuição da produção da goma, fato devido à compactação do meio que dificulta a difusão de ar. Uma significativa melhora é notada quando há a adição do bagaço de cana, contribuindo para a melhoria da distribuição de ar. Mesmo com a diminuição da proporção do bagaço de mandioca, essa pequena redução na concentração de fonte carbono não influenciou negativamente a produção. As maiores produtividades foram conseguidas com uma taxa de 10% de inoculação.

FIGURA 18. Superfície de resposta para a produção de goma xantana mostrando os resultados da influência da % de taxa de inóculo e da proporção em % de BM em relação ao BC



A equação abaixo foi ajustada aos dados experimentais:

$$G. \text{ xantana (g/Kg b.seca)} = -121,063 + 4,2939 (\%BM) - 0,0282(\%BM)^2 + 27,8091 (\%INOC.) - 1,1177 (\%INOC.)^2$$

Onde:

G. xantana = produção de goma xantana (g/Kg base seca)

%BM = proporção de bagaço de mandioca

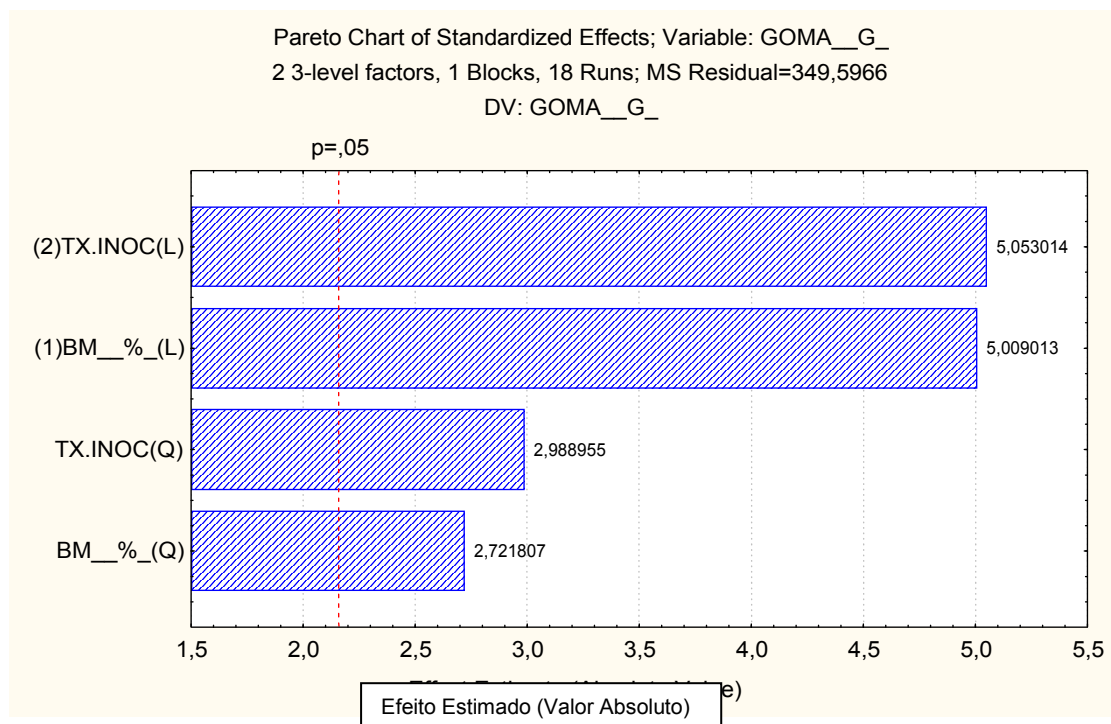
%INOC. = porcentagem de taxa de inóculo

A Tabela 22 mostra que a análise de variância dos dados experimentais indicando que o modelo ajustado é adequado para explicar a variação na produção de goma xantana ao nível de confiança de 95% e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,83743$ e R^2 ajustado = 0,78741 explica 78,74% da variação das respostas encontradas. O coeficiente de correlação encontrado é aceitável para este tipo de teste. Esta modelagem mostrou-se adequada, podendo ser utilizada para fins preditivos. O gráfico de pareto da Figura 19 mostra a influência e os efeitos significativos das variáveis % de bagaço de mandioca e % taxa de inoculação, indicando que no intervalo estudado, as variáveis testadas influenciaram a variável resposta (produção de goma xantana) ao nível de significância de 5%.

**TABELA 22. Análise de variância para a variável resposta
produção de goma xantana utilizando Bagaço de Mandioca**

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	VALOR P
Proporção BM/BC (%) (L)	8771,45	1	8771,452	25,09021	0,000239
Proporção BM/BC (%) (Q)	2589,89	1	2589,894	7,40823	0,017453
Taxa de Inoculação (%) (L)	8926,23	1	8926,235	25,53296	0,000221
Taxa de Inoculação (%) (Q)	3123,24	1	3123,245	8,93385	0,010459
Erro experimental	4544,76	13	349,597		
Total Soma Quadrados	27955,58	17			
R^2	0,83743				
R^2 ajustado	0,78741				

FIGURA 19. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos da % de BM e da % da taxa de inoculação para o modelo de produção de goma xantana



Os resultados obtidos utilizando bagaço de mandioca 90% e bagaço de cana 10%, com uma taxa de inoculação de 10% foram satisfatórios, quando comparados aos conseguidos por outros autores. STREDANSKI *et al.* (1999), utilizando como suporte o resíduo de malte gerado na produção cerveja, impregnado com solução nutritiva, conseguiu uma produção de 104,3 g/Kg de goma xantana na base seca.

Com base nestes estudos e também no fato da combinação de farelo de soja / bagaço de cana ter demonstrado uma menor produção de goma xantana, optou-se por continuar os estudos de otimização utilizando somente o bagaço de mandioca 90% e bagaço de cana 10%, com uma taxa de inoculação de 10% em relação à salina.

5.5 Estudo Cinético do Tempo de Produção da xantana por FES usando Bagaço de Mandioca *in natura* e Bagaço de Cana

Após a definição de parâmetros físicos e químicos que influenciaram o processo de produção de goma xantana, realizou-se estudo cinético com o objetivo definir qual o melhor tempo para a produção do biopolímero.

As fermentações foram realizadas de acordo com o item 4.6.4 e o estudo da cinética da produção da goma xantana foi feito acompanhando-se a fermentação por 7 dias a 30°C em duplicata com as condições otimizadas. Os resultados do acompanhamento deste estudo estão apresentados na Tabela 23.

TABELA 23. Evolução da cinética final de produção de goma xantana por FES utilizando BM 90% / BC10% e taxa de inóculo 10%

Tempo de Fermentação (Horas)	pH final	Umidade final (%)	Produção de Goma (g/Kg base seca) Média
Tempo 0	6,9	84,6	NP
24	6,73	83,24	12,25
48	6,71	75,15	58,36
72	6,55	67,01	120,53
96	6,42	66,70	184,58
120	5,99	64,36	215,63
144	5,85	63,40	210,98

NP = não houve produção de goma

Este estudo mostra que a melhor produção de goma xantana foi conseguida após 120 horas de fermentação, ou seja, no sexto dia, e evidenciou-se também uma forte perda de umidade nesse período, porém esta perda de umidade não influenciou negativamente a produção do polissacarídeo, já que neste ponto ocorreu a maior a produção. Após 144 horas, no sétimo dia, houve uma queda na produção, provavelmente devido ao esgotamento dos açúcares presentes no bagaço de mandioca.

Com relação à perda de umidade, algumas medidas podem ser tomadas a fim de se preservar as condições de iniciais como, por exemplo, adições de água ao longo do tempo ou também a realização da fermentação em condições de atmosfera saturada de umidade.

5.6 Estudo com diferentes umidades em condições otimizadas para FES

Este estudo realizado em frascos erlenmeyer, conforme o item 4.6.3, teve como objetivo, encontrar o melhor teor de umidade, menor do que os até então utilizados que permitisse uma melhor passagem do ar pela coluna de fermentação, já que a umidade de 85% não se mostrou compatível com o uso das colunas por terem apresentado uma leve compactação. As umidades testadas foram 70, 75 e 80% em condições já otimizadas conforme o item 4.6.3.2 (BM90%/BC10%) e taxa de inóculo continuou sendo de 10%.

A média dos resultados obtidos é mostrada na Tabela 24.

TABELA 24. Produção de goma xantana em diferentes umidades testadas

Umidade inicial	Umidade Final	Goma (g/Kg) base seca	pH final
70%	59,72%	151,07	6,32
75%	64,89%	166,32	5,26
80%	68,63%	199,14	5,78

Este estudo mostra que a umidade do substrato é um fator importante no processo fermentativo e deve ser mantido em torno de 80-85% para não prejudicar a produção de goma nas condições de fermentação estudadas. Como o uso das colunas de Raimbault não permite o uso de umidades maiores que 80%, devido à compactação do substrato causada pela água livre, este é um provável fator limitante para o processo.

5.7 Teste em colunas de Raimbault para FES

De acordo com o item 4.6.4 realizou-se este estudo, com objetivo de verificar a influência da aeração forçada sobre a produção da goma xantana. As fermentações foram realizadas em colunas de Raimbault, em duplicata, onde se testaram 3 valores de aeração: 20, 40 e 60 mL ar/min (2, 4 e 6 mL de ar/min.grama de matéria seca).

Para este teste utilizou-se outro valor de umidade (80%) que permitisse o uso do substrato sólido sem a compactação do meio, já que a umidade de

85% não se mostrou compatível com as colunas por permitir a compactação. A taxa de inóculo continuou sendo de 10%.

Os dados da Tabela 25 demonstram a produção de goma xantana em colunas de Raimbault.

TABELA 25. Produção de goma xantana em colunas de Raimbault utilizando aeração forçada

Aeração (mL ar/min.)	Aeração (mL ar/min.g ms)	pH final	Umidade final	Produção de Goma (g/Kg ms) média
20	2	6,42	74,61	118,6
40	4	6,18	70,70	155,3
60	6	6,25	69,50	165,32

A partir dos experimentos em colunas de Raimbault pode-se dizer que nas condições testadas, o uso de aeração forçada não levou ao aumento da produção de goma xantana, ou seja, um aumento na altura do leito de substrato, mesmo com o fornecimento de ar não foi favorável ao processo, pois a produção de goma xantana foi significativamente menor nas colunas. Os experimentos anteriores, realizados em frascos Ernlenmeyer tiveram uma produção maior que chegou a 218,23 g/Kg do polissacarídeo na base seca, onde o sistema de aeração ocorre por difusão, desde que mantidas pequenas alturas de leito. Isto indica que estudos de fermentação em bandejas pode ser uma alternativa viável para o processo de produção de goma xantana em FES, utilizando-se bagaço de mandioca e bagaço de cana, na proporção de 90:10 como substrato.

6. CONCLUSÃO

O processamento de produtos agroindustriais gera todos os dias no Brasil uma enorme quantidade de resíduos, como por exemplo, bagaço de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar. Estes resíduos sólidos têm enorme potencial, mas são praticamente inexplorados. O bagaço de mandioca, devido seu alto teor de matéria orgânica e açúcar, tanto na forma diretamente fermentescível quanto na forma de polímero se apresenta como resíduo altamente poluidor, juntamente com o bagaço de cana. Estes resíduos, simplesmente dispostos no meio ambiente causam um grave impacto ambiental. A viabilização do uso destes produtos em processos biotecnológicos se apresenta como uma opção importante para minimizar o impacto ambiental, agregando valor a estes resíduos e oferecendo as indústrias a opção de substratos alternativos mais baratos para diminuir os custos de produção de uma grande variedade de insumos industriais.

Neste trabalho, foram testados diversos resíduos e subprodutos da agroindústria, assim como diversas cepas da bactéria *Xanthomonas campestris*, com o intuito de desenvolver um bioprocesso alternativo para a produção da goma xantana. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- Na etapa de seleção da cepa *Xanthomonas campestris* a ser utilizada, a cepa designada LPB01 apresentou os melhores resultados em teste por fermentação submersa quando comparada à produção das outras cepas de *Xanthomonas campestris*. Esta cepa demonstrou maior produção de biomassa e de polissacarídeo com todos os substratos, quando comparada à cepa CCT 5677, evidenciando sua capacidade superior em termos de produtividade. As cepas CCT 6510, CCT 6507 e CCT 6508 testadas não tiveram produção significativa de goma xantana.
- Durante a etapa de fermentação submersa, observou-se também uma baixa produção de goma pela cepa LPB01 utilizando soro de queijo, fato este que torna inviável a utilização deste substrato para a produção de goma xantana.
- Em ensaio por FES com os cinco substratos na forma líquida, onde o bagaço de cana foi impregnado com diferentes concentrações das

soluções impregnantes (melaço de soja, caldo de cana e Milhocina®, hidrolisado de bagaço de mandioca e hidrolisado de polpa cítrica), a produção do polissacarídeo já se mostrava promissora, mesmo sem as condições estarem otimizadas. Os resultados utilizando melaço de soja (98,57 g/Kg de goma na base seca), hidrolisado de polpa cítrica (53,27 g/Kg de goma) e hidrolisado bagaço de mandioca (67,80 g/Kg de goma na base seca) foram significativos para a produção da goma xantana por FES quando comparados ao experimento de fermentação submersa inicial (14,12 g/L de goma utilizando hidrolisado de bagaço de mandioca).

- Durante o processo de otimização, o bagaço de mandioca e o bagaço de cana combinados, demonstraram elevado potencial na produção de goma xantana. O melhor resultado (218,23 g/Kg goma na base seca) foi obtido com a combinação de 90% bagaço de mandioca (substrato), 10% bagaço de cana (suporte) com 10% de taxa de inoculação, já que a utilização do bagaço de mandioca puro gerou uma compactação do meio que foi resolvida com a adição do bagaço de cana melhorando a difusão de ar no meio.
- O uso de aeração forçada em colunas de Raimbault não levou ao aumento da produção de goma xantana, pois um aumento na altura do leito de substrato, mesmo com o fornecimento de ar não foi favorável ao processo, já que a produção de goma xantana foi significativamente menor nas colunas (165,32 g/Kg de goma). Os experimentos anteriores, realizados em frascos Ernlmeyer tiveram uma produção maior, onde o sistema de aeração ocorre por difusão, desde que mantidas pequenas alturas de leito indicando que estudos de fermentação em bandejas podem ser uma alternativa viável para o processo de produção de goma xantana em FES.
- Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a produção de goma xantana por FES utilizando matérias primas agrícolas de baixo custo como o bagaço de mandioca e o bagaço de cana são uma alternativa viável à produção do biopolímero por fermentação submersa e todas as limitações deste processo.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos mostraram a viabilidade do bioprocesso desenvolvido utilizando bagaço de mandioca como substrato e bagaço de cana como suporte na produção de goma xantana, por fermentação no estado sólido. Porém, alguns pontos ainda podem ser explorados, como por exemplo:

- Teste com outras fontes de nitrogênio alternativas a fim de se reduzir o custo de produção da goma xantana.
- Testar a influência de diferentes sais na produção de goma xantana.
- Utilizar outros materiais alternativos para a fermentação no estado sólido, dando preferência aos resíduos agroindustriais tais como: farelo de trigo, farelo de arroz, entre outros.
- Testar a influência sob a produção de goma, de outras concentrações e idade do inóculo.
- Estudo com diferentes valores de umidade inicial a fim de se verificar sua influência sobre a produção da xantana.
- Estudar a influência de outros valores de temperatura na produção do inóculo e durante a fermentação.
- Testar outros tipos de reatores para a fermentação no estado sólido, como por exemplo, do tipo bandeja.
- Realizar o estudo de respirometria da FES para a produção da goma xantana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. **Brasil Deverá Produzir 225 Milhões de Toneladas de Mandioca em 2005**. Ano II. N° 8 Set/Dez, 2004.

ABECITRUS – Disponível em: http://www.abecitrus.com.br/historia_br.html#renasce Acesso em Out. 2006.

ABIPTI. Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica. **Manual dos Derivados de Cana-de-Açúcar**. Brasília: ABIPTI, 474 p. 1999.

ADM - Archer Daniels Midland Company - Disponível em: <http://www.admworld.com/lapo/ahn/vegetableprotein.as> Acesso em Nov. 2006.

ATKINSON, B. & MAVITUNA, F. **Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook**. Macmillian Publisheres: México. 2.ed. 1271p., 1991.

AURIA, R.; PALACIOS, J.; & REVAH, S. Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO₂ and O₂ in solid state fermentation. **Biotechnology Bioengineering**, 39:898-902, 1992.

BARRIOS-GONZALES, J.; GONZALES, H. & MEJIA, A. Effect of particle size, parking density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. **Biotechnology Advances**, 11: 539-547, 1993.

BEAUSEJOUR, D.; LEDUY, A.; RAMALHO, R. Batch cultivation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, 56: 522-526, 1981.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. **Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective**. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 50: 145-152, 1998.

BEUX, M. R. **Biofermentação de resíduos agroindustriais do Estado do Paraná no cultivo de fungo saprófita comestível *Lentinula edodes* (shiitake)**. Curitiba, 1995. 130 f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química – Ênfase em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Engenharia Química, UFPR.**

BILANOVIC, D; SHELEF, G.; GREEN, M. Xanthan Fermentation of citrus waste. **Bioresource Technology**, 48: 169-172, 1994.

BRADBURY, J. F. *Xanthomonas* dowson. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore: Williams & Wilkins, v. 1, 1984.

BRANDFORD, P. A.; BAIRD, J. In: G.O. Aspinall, Editor, **The Polysaccharides 2**, Academic Press, New York, 411–490, 1983.

CALAM, C. T. Starting investigational and process cultures. **Process Biochemistry**, 11(3): 7-12, 1976.

CARTA, F. S. **Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca e produção de ácido fumárico por fermentação do fungo *Rhizopus***. Curitiba, 1999. 150 f. **Dissertação (Mestrado Tecnologia Química) – Setor de Engenharia, UFPR.**

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**, 26: 282-291, 2000.

CASTILHO, L. R., MEDRONHO, R. A., ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technol.** 71(1): 45-50, 2000.

CEREDA, M. P. Caracterização de resíduos da industrialização da mandioca. In: **CEREDA, M. P. Industrialização da Mandioca no Brasil**. São Paulo: Paulicéia, 11-50, 1994.

CONCEIÇÃO, A. J. **A mandioca**. São Paulo: Nobel, 382 p. 1987.

COOPER, S. B.; VACLAVIK, V. A.; CHRISTIAN, E. W. **Essentials of Food Science**. 2.ed. Ed. Springer. 500p. 2003.

COPERSUCAR - Disponível em:
<<http://www.copersugar.com.br>> Acesso em Jan. 2006.

CORBETT, K. Production of antibiotics. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**, Academic Press, 425-448, 1987

CORN PRODUCTS. **Ficha Técnica: Ingredientes Protéicos Milhocina®**, 2005.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, Vol.2, n. 2, 1992.

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

COTTRELL, I. W.; KANG, K. S.; KOVACS, P. Xanthan gum. In: **Handbook of water-soluble gums and resins**. Cap. 24. Davidson, R, L. Ed. McGraw-Hill, New York, 1-31, 1980.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, 76: 291-302, 2006.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**, 39: 411-414, 2003.

DAVIDSON, I. W. Production of polysaccharide by *X. campestris* in continuous culture. **FEMS Microbiological Letters**, 3 (6): 347-349, 1978.

DAWES, I. W. & SUTHERLAND, I. W. **Microbial Physiology**. 2ed. Ed. Blackwell Scientific Publications, Londres, 289 p. 1992.

DILTZ, S.; ZELLER, S. G. Location of O-acetyl groups in S-657 using the reductive cleavage method. **Carbohydrate Research**, 331: 265-270, 2001.

ECHEVARIA, J.; LEON, J. A. R.; ESPINOSA, M. E., & DELGADO, G. Optimization of solid state fermentation using sugarcane by *Aspergillus niger* considering the particle size effect. **Acta Biotechnologica**, 11: 15-22, 1991.

EMBRAPA - Disponível em:

<<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/cot/COT73.html>> Acesso em Out. 2006.

FAN, L. **Produção de fungo comestível do gênero *Pleurotus* em bio-resíduos agroindustriais**. Curitiba, 1999. 105 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química – Ênfase em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Engenharia Química, UFPR.

FARIA, S.; FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. **Produção de Goma Xantana utilizando caldo de cana**. SHEB 2005, Anais do Congresso.

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**, 65(6): 2485-2491, 1999.

FRANK, J.F.; SOMKUTI, G. A. General properties of beta-galactosidase of *Xanthomonas campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, 38(3): 554-556, 1979.

GALINDO, E. Aspects of the process for xanthan production. **TransICHE**, parte C, (72), 1994, p. 227-237.

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

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial polysaccharides and polyesters. In: **Microbial Biotechnol.** W. H. Freeman and Company, New York, 266-282, 1994.

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

HÖLKER, U.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid state fermentation with fungi. **Appl. Microbial Biotechnology**. 19: 393-397, 1984.

HUNT, G. R.; STIEBER, R. W. Inoculum Development. In: Demain, A. L.; SOLOMON, N. A., ed. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, American Society of Microbiolog, Washington, 32-40, 1986.

ICPDCA – Instituto Cubano de Pesquisa da Cana-de-Açúcar. **Manual dos Derivados de Cana-de-Açúcar**. ABIP II, 1ed, 468, 1999.

IELPI, L.; COUSO, R. O.; DANKERT, M. A. Sequential Assembly and Polymerization of the Polyprenol-Linked Pentasaccharide Repeating Unit of the Xanthan Polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **Journal of Bacteriology**, v. 175 (9), 2490-2500, 1993.

IMPACTOS AMBIENTAIS NA CADEIA PRODUTIVA DA MANDIOCA: MESA REDONDA, Disponível em:

<<http://www.suct.ms.gov.br/mandioca/palestras/Tratamento%20e%20uso%20de%20res%C3%ADduos%20de%20mandioca%20-%20Simone%20Damasceno.doc>> Acesso em Out. 2006.

JUNGBUNZLAUER, Disponível em:

<<http://www.jungbunzlauer.com/products-applications/products/xanthan-gum.html>> Acesso em Set. 2006.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; KYRIAKIDES-LIAKOPOULOU M.; Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, 39: 249-256, 2003.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, 59: 81-84, 1998.

KENNEDY, J. F. & BRADSHAW, I. J. Production, properties and applications of Xanthan. In: **Progress in Industrial Microbiology**, vol. 19, Modern Applications of Traditional Biotechnologies, Bushell, M.E. Elsevier Science Publishing Co. Inc. Netherlands, 319 – 370, 1984.

KOLICHESKI, M. B. **Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido utilizando como substrato Bagaço de Mandioca**. Curitiba, 1995. 137 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, UFPR.

LAWRENCE, A. **Natural Gums for Edible Purposes**. Noyes Data Corporation. New Jersey, U.S.A. 338 p. 1976.

LEE, B. H. *Fundamentals of food Biotechnology*. United States: **VCH Puyblishers Inc.**, 1996.

LIU, B. L.; TZENG, Y. M. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptide in solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, 21: 657-661, 1999.

LO, Y. M.; YANG, S. T.; MIN, D. B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, (47), 689-694, 1997.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, V. 2, 125-154, 2001.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., V. 3, 247-270p., 2001.

MACHADO, R. P. **Produção de Etanol a partir de melão de soja**. Porto Alegre, 1999. 120 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos) – Setor de Engenharia Química, UFRG.

MACHADO, C. M. M. **Produção de Ácido Giberélico por fermentação no estado sólido em bio-resíduos da agroindústria do café**. Curitiba, 2000. 73 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química – Ênfase em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Engenharia Química, UFPR.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources – a review. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2: 237-241, 1999.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 58: 428-434, 2002.

MAIORELLA, B. L.; CASTILLO, F. J. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. **Process Biochemistry**, 19: 158-161, 1984.

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. In: **Comprehensive Biotechnology**, ed. M. Moo-Young. Pergamon Press, Oxford, 1005-1041, 1985,

MATOS, T. A. **Tratamento de resíduos agroindustriais**. Curso sobre tratamento de resíduos agroindustriais. Fundação Estadual do Meio Ambiente, Departamento de Engenharia Agrícola e Ambiental, Universidade Federal de Viçosa, 2005.

MAUGERI, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos**

Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 3, 2001.

MEDEIROS, A. B. P. **Produção de compostos voláteis aromáticos por *Klüyveromyces marxianus* em fermentação no estado sólido da casca de café.** Curitiba, 1998. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química – Ênfase em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Engenharia Química, UFPR.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 71 (1): 61-64, 1994.

McNEELY, W. H. & KANG, K. S. Xanthan and others biosynthetic gums: In: **Industrial gums: Polysaccharides and their derivates.** WHISTLER, R. L. & BeMILLER, J. Cap. 21. 2. ed. Academic Press. Inc: London. 473-497, 1973.

MORADI-ARAGHI, A. A review of thermally stable gels for fluid division in petroleum production. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 26: 1-10, 2000.

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação do biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*.** Pelotas, 2002. Tese (Doutorado - Programa de Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, (UFPel).

MORESI, M. Cost/benefit analysis of yeast and yeast autolysate production from cheese whey. **Italian Journal of Food Science**, 6: 357-370, 1994.

MORRIS, V. J. Science, structure and applications of microbial polysaccharides. In: PHILLIPS G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. **Gums and Stabilishers For the Food Industry.** Oxford: IRL Press, 315p., 1992.

NAMPOOTHIRI K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. **Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*.** Process Biochemistry, v. 38, n. 11, (30)1513-1519 (7), 2003.

NAVARRETE, R. C.; SHAN, S. N. **New Biopolymer for coiled tubing applications.** Society of Petroleum Engineers, 68487, Richardson, TX, USA, 1-10, 2001.

NAVARRO, F. N. **Fundamentos de Reologia de Biopolímeros,** EDUCS: Caxias do Sul, 1997.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153: 375-380, 1944.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P.; KNAUSS, C. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in a whey-based medium. **Revista de Microbiologia**, v. 28: 148-151, 1997.

OOIJKAAS, L. P.; WEBER, F. J.; BUITELAAR, R. M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends Biotechnol.**, v. 18, n. 2, p. 356-360, 2000.

PACE, G. Polímeros microbianos. In: BU'LOOCK, John; KRISTIANSEN, Bjon. **Biotecnología Básica**. Traducción: Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acríbia, 449-462, 1991

PAOLUCCI, A. A. P. **Formulação de um meio de cultura a base de soro de queijo para produção de *Lactococcus lactis* sp *Lactis***. Viçosa, 1991. 66 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFMG).

PARAÍSO, P. R. **Modelagem e análise do processo de obtenção do óleo de soja**. Campinas, 2001, 200 p. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas (Unicamp).

PASQUEL, A. Gomas: utilização e aspectos reológicos. **Boletim SCBCTA**, 33 (1): 86-97, 1999.

PASTRANA, L. M.; GONZALES, M. P.; PINTADO, J.; MURADO, M. A. Interactions affecting gibberellic acid production in solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, 17: 784-790, 1995,

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Influência das condições de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus Awamori***. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Mestrado em Engenharia, 1997.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, 27: 109-117, 1992.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation**. In: A. Pandey (Ed.) (pp. 3-10). New Delhi: Wiley Eastern Publishers, 1994.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R., & NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, 77: 149-162, 1999.

PANDEY, A.; AZMI, W.; SINGH, J.; BANERJEE, U. C. **Biotechnology: food fermentation**. In: V. K. Joshi, A. Pandey (Eds). New Delhi: Educational Publishers & Distributors, 1: 383-4260, 1999a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: II Cassava bagasse. **Bioresource Technology**. V. 74, p. 81-87, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 31: 135-152, 2001.

PARTON, C.; WILLIS, P. Strain Preservation, inoculum preparation, and development. In: McNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Fermentation: a practical approach**, IRL Press, Oxford, 39-64, 1990.

PELCZAR, M. J. & REID, R. D. **Microbiologia**. Tradução do inglês por Leopoldo Hontañon y colaboradores. 2. ed. Madri. 664p., 1966.

PENNA, A. L. B. Hidrocolóides: usos em alimentos. **Fi Food Ingredients**, São Paulo, 3(17): 58-64, 2002.

PESQUISA FAPESP Revista - Disponível em:

<<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=378&bd=1&pg=1&lg=>> Acesso em Out. 2006.

PETERS, H. V.; HERBST, H.; HESSELINK, P. G. M.; LÜNSDOR, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. D. Influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 34: 1391-1397, 1989.

PETTIT, D. J. Xanthan Gum. In: **Polisaccharides in Food**. Parte V, Cap. 17. Blanshard, J. M. V. & Mitchel, J. R. Ed. London, 263-282, 1979.

PINCHES, A.; PALLENT, L.J. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. **Biotechnol. Bioeng.** 28: 1484–1496, 1986.

POLI-NUTRI Alimentos, **Farelo de soja: processamento e qualidade** - Disponível em: <http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_janeiro.htm> Acesso em Nov. 2006.

PONS, A.; DUSSAP, C. G., GROS, J. B. Modelling *Xanthomonas campestris* batch fermentations of a bubble column. **Biotechnol. Bioeng.** 33: 394-405, 1989.

PONS, A.; DUSSAP, C. G., GROS, J. B. Xanthan batch fermentations: compared performance of a bubble column and a stirred tank fermentor. **Bioprocess Engineering**, 5:107 – 14, 1990.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. E CASTRO GOMES, R. J. H. **Soro de leite – Obtenção, características e aproveitamento: Revisão**. Seminário Cia. Agropecuária, Londrina, 13: (1) 92 – 96, 1982.

PONSANO, E.H.G.; CASTRO-GOMEZ, R.J.H. Fermentação de soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa para a redução de sua carga poluente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 15: 170-173, 1995.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a partir de Bagaço de Mandioca.** Curitiba, 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia, Ênfase em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Engenharia Química, UFPR.

RAIMBAULT, M. General and microbial aspects of solid state fermentation. In: **International training Course on Solid State Fermentation**, FMS 97, p. 6-10 OCTOBRE, Curitiba, Brasil, Documento ORSTOM, Montpellier, França, 1997.

RAYMOND, A.; YOUNG, M. A. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. In: **Technology & Industrial Arts**, Ed. John Wiley and Sons. 592p, 1998.

REIS, A. J. **Aspectos econômicos da mandioca.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 13: (145) 3-8, 1987.

REISMAN, H. B. Economic analysis of fermentation process, **CRC Press**, 14-35, 1988.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Ácido Cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** Curitiba, 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, UFPR.

ROSALAM, S., ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, 939: 197-207, 2005.

ROTAVVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para a produção de goma xantana.** Erechim, 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, (URI), Campus Erechim.

ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; PREBOIS, J. P., & LONSANE, B. K. Zymotis, a large scale solid state fermenter-design and evaluation. **Applied Biotechnology and Biotechnolgy**, 42: 37-52, 1993.

SANDERSON, G. R. Polysaccharides in foods. **Food Technol.** 35(83): 50–57, 1981.

SANDFORD, P. A. Exocellular microbial polysaccharides. **Adv. In Carb. Chem. Biochem.** 36: 292-296, 1979.

SANDFORD, P. A. Potential important microbial gums. In: GLICKSMAN M. **Food hydrocolloids.** Ed. Boca Raton: C.R.C. Press, 1: 168-199, 1982.

SANDFORD, P. A.; BAIRD, J. In: Aspinall GO, editor. **The polysaccharides.** Prague: Academia Press, 470-7433, 1983.

SANTOS, V. E. **Producción de xantano**. PhD thesis. Madrid, Spain: Universidad Complutense, 1993.

SARRETE, M.; NOUT, M. J. R.; GERVAIS, P.; ROMBOUTS, F. M. Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 37: 420-425, 1992

SARTORI, A. E. R. **Modelagem, simulação e controle de um secador rotativo industrial**. Maringá, 2001, 92 p. Dissertação (mestrado em Desenvolvimento de Processos), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá (UEM).

SBRT - **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas** - Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br/upload/sbrt776.html> Acesso em Agosto 2006.

SEBRAE – **Apostila de treinamento** - Disponível em: www.sebraemg.com.br/geral/arquivo_get.aspx?cod_areasuperior=2&cod_areaconteudo=231&cod_pasta=234 Acesso em Nov. 2006.

SHU, CH-H & YANG, SH-T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnol Bioeng** 35: 454–468, 1990.

SILVA, A.G. Algodão, amendoim e soja. In: **SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS**, Piracicaba, S.P. *Anais*. Piracicaba: FEALQ. 47-72. 351p. 1995.

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

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao Estudo da Fermentação no Estado Sólido em Relação com a Produção de Ácido Fumárico, Biotransformação de Resíduo Sólido de Mandioca por *Rhizopus* e Basidiomicetos do Gênero *Pleurotus*** – Tese para o Concurso Público de Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 228 p., 1994.

SOCOOL, C. R. **Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido**. Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Engenharia Química, 1996. Livro de resumos. Lavras, MG. 1996.

SOCCOL, C. R.; CABRERO, M. A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. **Selection of Growing on Raw Cassava**, VI International Symposium on Microbial Ecology, Barcelona, 6-11 Septiembre, 1992.

SOCCOL, C. R.; WOIECHOWSKI, A. L.; PANDEY, A. **Production of xanthan gum from cassava bagasse hydrolysate**; Brazilian Patent no INPI No 001544, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Brazil, December 27, 2000.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A. **General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation**. In: Encyclopedia on Bioresource Technology. New York: Hawort Press, 2002.

SOMOGYI, M. A New Reagent for Determination of Sugar. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SMAIL, T.; SALHI, O.; KNAPP, J. S. Solid state fermentation of carob pods by *Aspergillus niger* for protein production-effect of particle size. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 11: 171-173, 1995.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas a α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, UFPR.

STERTZ, C. Z. **Bioconversão da farinha de mandioca crua (*Manihot esculenta*, Crantz) por fungos do gênero *Rhizopus* em fermentação no estado sólido**. Curitiba, 1997. 120 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química – Ênfase em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Engenharia Química, UFPR.

STREDANSKI, M. & CONTI, E. Xanthan production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**. 34: 581-587, 1999.

STREDANSKI, M., CONTI, E., NAVARINI, L., BERTOCCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**. 34: 11-16, 1999.

SUHTERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**, 16: 41-46, 1998.

SUTHERLAND I. W. **Biotechnology of microbial polysaccharides**. UK: Cambridge University Press, 1990.

SWINGS, J. G.; VAUTERIN, L. & KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: **Swings, J.G. & Civerolo, E.L.** (Eds.) *Xanthomonas*. London. Chapman & Hall. p.128, 1993.

TEIXEIRA, C.G. **A soja na alimentação humana** - Disponível em: <<http://www.vegetarianismo.com.br/artigos/soja1.html>> . Acesso em Abr. 2005.

TONIAL, T. M. **Otimização do crescimento do fungo comestível *Volvariella volvacea* em fermentação no estado sólido e em fermentação submersa a partir de resíduos agroindustriais**. Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química – Ênfase em tecnologia de Alimentos) – Setor de Engenharia Química, UFPR.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. **Sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em manipueira sob condições ambientais**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 37, n. 7, 2002.

THORNE, L. ; TANSEY, L.; POLLOCK, T.J. Direct utilization of lactose in clarified cheese whey for xanthan gum synthesis by *Xanthomonas campestris* . **Journal of Industrial Microbiology** , 3(5): 321-328, 1988.

UFRG - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Instituto de ciência e tecnologia de alimentos. Laboratório de biotecnologia, **Relatório parcial PSPPG Processo 520712/99** - Disponível em:

<http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/Projetos%20Plano%20Sul/ufrgs_relatorio2002.htm> Acesso em Nov. 2006.

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos. **Relatório Técnico: Análises Químicas e Cromatográficas de Amostras do Processo de Produção de Proteína de Soja**, Outubro, 2004.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J-M. Solid State Fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, 74(2):175-178, 2000.

VASHITZ, O; SHEINTUCH, M. Analysis of polymer synthesis rates during steady-state growth of *X. campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 37(4): 383-385, 1991.

VOJNOV, A. A.; ZORREGUIETA, A.; DOW, J. M.; DANIELS, M. J.; DANKERT, M. A. **Microbiology** 144: 1487-1493, 1998.

WAITES, M. J.; MORGAN , N. L.; ROCKEY, J. S.; HIGTON, G. **Industrial Microbiology**. Ed. Blackwell Publishing, 304p, 2001.

WERNAU, W. C. Fermentation methods for the production of polysaccharides. **Developments in Indian Microbiology**, 26: 263-269, 1985.

WHITE, H. L. **Introduction to Industrial Chemistry**. Ed. Wiley-Interscience, 272p., 1986.

WOIECHOWSKI, A. L. **Desenvolvimento de Bioprocesso para a produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca**. Curitiba, 2001. 153 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, UFPR.

YALPANI, M.; SANDFORD, P. A. Polysaccharides: synthesis, modification and structure. **Property relations**. Amsterdam: Elsevier, 1988.

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

YOSHIDA, T.; TANNER, R. D. **Bioproducts and bioprocess**. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 2, 1993.

ZADRAZIL, F., & PUNIA, A. D. Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugar bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresource Technology**, 54: 85-87, 1995.