ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE CAFÉ E DE MANDIOCA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Co-orientador: Prof. Dr. Ashok Pandey

CURITIBA
2001

ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE CAFÉ E DE MANDIOCA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Co-orientador: Prof. Dr. Ashok Pandey

CURITIBA
2001

Aos meus pais Alfredo e Maria,
pelo esforço e carinho dado aos filhos.
Ao meu esposo Marcio,
pelo apoio nesta jornada.
Aos meus filhos Felipe e Gustavo,
pela compreensão nos momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo constante apoio e incentivo nos momentos de dificuldade e de esmorecimento.

Ao Professor Carlos Ricardo Soccol, pelo acompanhamento, valiosa orientação, e constante estímulo no desempenho profissional.

Ao Professor Ashok Pandey pela sua co-orientação, por suas sugestões e apoio no decorrer deste trabalho, e em especial pelo exemplo de ser humano e de ponderação que nos dá.

Aos professores Beatriz Vahan Kilikian, Elba P. S. Bon, Eduardo Decchechi Nei Hansen de Almeida e Sandro Germano, por terem aceitado julgar este trabalho.

À Professora Vanete Tomaz Soccol, pela ajuda e presteza nos momentos de necessidade.

À Universidade Federal do Paraná, pela infra-estrutura que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, em especial à Mityio e ao Saul pela colaboração, incentivo, amizade e sugestões oferecidas durante todos os momento da realização deste trabalho, principalmente naqueles mais difíceis.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro, que auxiliou na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....iii
SUMÁRIO.....iv
LISTA DE FIGURAS.....x
LISTA DE TABELAS.....xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....xx
RESUMO.....xxi
ABSTRACT.....xxii
1. INTRODUÇÃO.....1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....4
2.1 Reaproveitamento de Resíduos.....4
2.2 A agroindústria cafeeira.....5
2.2.1 Resíduos da Agroindústria Cafeeira.....8
2.2.2 Utilização dos Resíduos da Agroindústria cafeeira.....9
2.3 A agroindústria de Mandioca.....10
2.3.1 O Resíduo da Agroindústria da Mandioca.....11
2.3.2 Utilização dos Resíduos da Agroindústria da mandioca.....12
2.4 O amido.....12
2.5 Processos de Hidrólise.....14
2.6 A bactéria *Xanthomonas campestris*.....15
2.7 A Goma Xantana.....16
2.7.1 Origem da Goma Xantana.....17
2.7.2 Estrutura da Goma Xantana.....18
2.7.3 Produção.....20
2.7.3.1 Meio de fermentação.....22
2.7.3.2 pH.....24
2.7.3.3 Temperatura.....25
2.7.3.4 Aeração.....26

2.7.3.5 Fonte de Nitrogênio.....27
2.7.4 Propriedades da Goma Xantana.....28
2.8 Propriedades Reológicas das Gomas Xantanas.....30
2.9 Aplicações da Goma Xantana.....35
2.9.1 Usos em indústria não alimentícias.....35
2.9.2 Usos na indústria alimentícia.....36
2.9.3 Usos na indústria farmacêutica.....37
2.10 Processos de Recuperação de Goma Xantana.....38
2.11 Secagem.....41
2.11.1 Secadores-pulverizadores.....42
2.11.2 Filtros Rotatórios a vácuo.....46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....49
3.1 Microrganismo.....49
3.2 Conservação da Cepa.....49
3.3 Preparo do Inoculo.....50
3.4 Substrato.....50
3.4.1 Preparo das Casca de Café.....51
3.4.2 Determinação da composição centesimal das cascas de café.....52
3.4.2.1 Umidade.....52
3.4.2.2 Cinzas.....52
3.4.2.3 Proteínas.....53
3.4.2.4 Lipídeos.....53
3.4.2.5 Açúcares Totais.....53
3.4.3 Preparo do Hidrolisado de Casca de Café.....53
3.4.4 Preparo do Bagaço de Mandioca.....55
3.4.5. Determinação da Composição Centesimal do Bagaço de Mandioca.....55
3.4.5.1 Umidade.....55
3.4.5.2 Cinzas.....56
3.4.5.3 Proteínas.....56
3.4.5.4 Lipídeos.....56
3.4.5.5 Amido.....56

3.4.6 Preparo do Hidrolisado de Bagaço de Mandioca.....57
3.4.6.1 Hidrólise ácida de bagaço de mandioca.....57
3.4.6.2 Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca.....59
3.5 Análises Físico-químicas Realizadas nos Hidrolisados de Casca de café.....60
3.5.1 pH.....60
3.5.2 Açúcar Redutor.....60
3.5.3 Cafeína.....60
3.5.4 Taninos.....60
3.6 Análises Físico-químicas Realizadas nos Hidrolisados do Bagaço de Mandioca.....61
3.6.1 pH.....61
3.6.2 Açúcar Redutor.....61
3.7 As Fermentações.....61
3.7.1 Fermentação com o hidrolisado de casca de café.....63
3.7.2 Fermentação com o hidrolisado casca de café e de bagaço de mandioca.....63
3.7.3 Fermentação com o hidrolisado ácido e enzimático de bagaço de mandioca.64
3.7.4 Testes com fontes alternativas de nitrogênio.....64
3.7.5 Fermentação em fermentador de bancada.....64
3.8 Análise Realizada nos Fermentados de Hidrolisados de Casca de Café.....65
3.8.1 Açúcar Redutor Residual.....65
3.8.2 Cafeína.....65
3.8.3 Taninos.....65
3.8.4 Biomassa.....65
3.8.5 Goma Xantana.....66
3.9 Análises Realizadas nos Fermentados de Hidrolisados de Bagaço de Mandioca.....66
3.9.1 Açúcar Redutor Residual.....66
3.9.2 Biomassa.....66
3.9.3 Goma Xantana.....66

3.10 Cinéticas do Processo Fermentativo com o Hidrolisado de Bagaço de Mandioca....66
3.10.1 Velocidade Volumétrica de formação de biomassa (r_x)....67
3.10.2 Velocidade Volumétrica de formação de produto (r_p)....67
3.10.3 Velocidade Volumétrica de consumo do substrato (r_s)....68
3.11 Avaliação das Eficiências de Conversão substrato-Produto ($Y_{p/s}$)....68
3.12 Avaliação das eficcias de conversão substrato-biomassa ($Y_{X/S}$)....68
3.13 Determinação das velocidades específicas....68
3.13.1 Velocidade específica de crescimento (Q_X)....69
3.13.2 Velocidade específica de formação de produto (Q_P)....69
3.13.3 Velocidade específica de consumo do substrato (Q_S)....69
3.14 Secagem da Goma Xantana Produzida com as Várias Fontes de Nitrogênio....69
3.15 Testes Reológico das Gomas Xantanas Produzidas Com as Várias Fontes de Nitrogênio Testadas....72
3.16 Espectro de Infra-vermelho das Gomas Xantanas Produzidas Com as Várias Fontes de Nitrogênio Testadas....73
3.17 Teste de Fermentação em Biorreator de Bancada....74
3.18 Teste de Secagem da Goma Xantana em Secador-pulverizador....74
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO....76
4.1 Composição Centesimal da Casca de Café....76
4.2 Auto-Hidrólise da Casca de Café....77
4.2.1 Planificação experimental 1: 3^2....77
4.3 Composição Centesimal do Bagaço de Mandioca....83
4.4 Hidrólise ácida do Bagaço de Mandioca....84
4.4.1 Planificação experimental 2: 3^3....84
4.5 Hidrólise Enzimática do Bagaço de Mandioca....92
4.6 Comparação Entre a Hidrólise Ácida e Enzimática do Bagaço de Mandioca....93
4.7 Comparação da Fermentação Com o Hidrolisado Ácido e Enzimático de Bagaço de Mandioca....94

4.8 Fermentações Com o Hidrolisado de Casca de Café.....96
4.8.1 Fermentação sem suplementação com fonte de nitrogênio.....96
4.8.2 Fermentação do hidrolisado de casca de café suplementado com extrato de levedura.....96
4.8.3 Fermentação do hidrolisado de casca de café suplementado com extrato de levedura após detoxificação com carvão ativo.....98
4.8.4 Fermentação do hidrolisado de casca de café sem detoxificação, misturado com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com extrato de levedura.....99
4.9 Fermentação do Hidrolisado Ácido de Bagaço de Mandioca.....102
4.9.1 Otimização da concentração de açúcar redutor no hidrolisado com fontes alternativas de nitrogênio.....102
4.9.2 Cinéticas do processo fermentativo.....107
4.9.3 Determinação dos parâmetros cinéticos dos processos fermentativos.....113
4.9.4 Determinação das velocidades específicas dos processos fermentativos.....117
4.10 Análises da Goma Xantana Produzida com as Fontes Alternativas de Nitrogênio Testadas.....120
4.10.1 Testes Reológicos.....120
4.10.2 Análises por Infra-vermelho.....125
4.10.3 Análise de nitrato na goma xantana produzida com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.....127
4.11 Teste de Fermentação em Fermentador de Bancada.....128
4.11.1 pH do meio de fermentação.....130
4.11.2 Fatores de conversão do processo fermentativo em reator de 8 L.....131
4.11.3 Parâmetros cinéticos do processo fermentativo em reator 8 L.....132
4.11.4 Velocidades específicas do processo fermentativo em reator de 8 L.....133
4.12 Ensaio de Secagem da Goma Xantana em Secador-pulverizador.....135
5 CONCLUSÃO.....138
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....142
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....143
ANEXOS

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....142

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....143

ANEXOS

ANEXO 1. ENSAIOS REOLÓGICOS DAS GOMAS XANTANAS PRODUZIDAS COM AS FONTES ALTERNATIVAS DE NITROGÊNIO

ANEXO 2. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DAS GOMAS XANTANAS PRODUZIDAS COM AS FONTES ALTERNATIVAS DE NITROGÊNIO

ANEXO 3. ANÁLISE DE NITRATO NA GOMA XANTANA PRODUZIDA COM NITRATO DE POTÁSSIO

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1. Os frutos do cafeeiro.....6

FIGURA 2. Os vários estágios das cerejas de café.....6

FIGURA 3. Fluxograma do processamento via seca e via úmida das cerejas de café mostrando os pontos onde são gerados os resíduos sólidos e líquidos.....7

FIGURA 4. Raiz da mandioca.....10

FIGURA 5. Fluxograma do processamento industrial das raízes de mandioca para a obtenção da fécula, mostrando onde é gerado o bagaço de mandioca.....11

FIGURA 6. A bactéria *Xanthomonas campestris.* Micrografia(x12.000).....15

FIGURA 7. Estrutura básica proposta para o exopolissacarídeo produzido pela *X. campestris*.....19

FIGURA 8. Fluxograma do processo de produção da Goma Xantana.....22

FIGURA 9. Influencia da temperatura na taxa de crescimento específico da bactéria *X. campestris* (μ_x), e no coeficiente de rendimento de biomassa em nitrogênio (Y_{XN}).....25

FIGURA 10. Transição conformacional das estruturas ordenada e desordenada da goma xantana.....29

FIGURA 11. Representação gráfica para a definição de viscosidade.....31

FIGURA 12. Curva de escoamento de fluídos em função da relação Tensão de Cisalhamento (τ) e da velocidade de cisalhamento (γ).....33

FIGURA 13. Viscosidade de vários polissacarídeos puros e associados.....34

FIGURA 14. Precipitação da goma xantana usando solventes orgânicos.....40

FIGURA 15. Precipitação de goma xantana usando misturas de isopropanol com 1 g/L de sais mono e divalentes.....41

FIGURA 16: Instalação e funcionamento de secador-pulverizador típico, incluindo um resfriador pneumático do produto.....44

FIGURA 17: Relação entre o volume da câmara de vaporização e a Capacidade de evaporação de secadores pulverizadores, com dados baseados em um tempo de retenção total do sólido de 20 s.....46

FIGURA 18. Diagrama de operação contínua dos filtros rotativos à vácuo. As sessões de 1 a 4 são de filtração, sessões de 5 a 12 são de deságüe, sessão 13 é de descarga da torta e sessões de 14 a 16 estão prontas para um novo ciclo.....47

FIGURA 19. Hidrolisados e os resíduos industriais utilizados: (A) casca e hidrolisado de casca de café. (B) bagaço e hidrolisado de bagaço de mandioca.....51

FIGURA 20. Cascas de café antes e depois do processamento para equalização da granulometria do material.....52

FIGURA 21. Cascas e hidrolisado de cascas de café.....54

FIGURA 22. Bagaço de mandioca antes e depois do processamento para equalização da granulometria do material.....56

FIGURA 23. Bagaço e hidrolisado ácido de bagaço de mandioca.....59

FIGURA 24 . Agitador de movimento orbital usado nas fermentações.....62

FIGURA 25. Processamento do caldo fermentado com a bactéria *X. campestris*, para obtenção da goma xantana.....70

FIGURA 26. Fluxograma de obtenção da goma xantana produzida com as fontes alternativas de nitrogênio testadas, para testes reológicos e de Infra-vermelho.....71

FIGURA 27. Reômetro marca HAAKE, modelo RheoWin Pro 2.67 usado na determinação da viscosidade das gomas xantanas obtidas por fermentação com o hidrolisado de bagaço de mandioca, suplementado com fontes alternativas de nitrogênio.72

FIGURA 28. Espectrômetro marca BOMEM, usado na determinação dos espectros de absorção na região do infra-vermelho

das gomas xantanas obtidas por fermentação com o hidrolisado de bagaço de mandioca, suplementado com fontes alternativas de nitrogênio.....73

FIGURA 29. Biorreator de bancada marca Marubishi, modelo MDL, usado na determinação dos parâmetros cinéticos.....74

FIGURA 30. Secador-pulverizador de bancada, marca Lab-Plant, Modelo SD-05, usado nos testes de secagem da goma xantana produzida por fermentação.....75

FIGURA 31. Gráfico Pareto para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de casca de café submetida a tratamento térmico por tempos definidos referente à planificação experimental 1, considerando-se interações de primeira e de segunda ordem.....80

FIGURA 32. Gráfico Pareto para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de casca de café submetida a tratamento térmico por tempos definidos referente à planificação experimental 1, considerando-se apenas interações de primeira ordem.....80

FIGURA 33. Superfície de resposta da concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de casca de café, em função da temperatura e do tempo de hidrólise.....82

FIGURA 34. Gráfico de contorno da concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de casca de café, em função da temperatura e do tempo de hidrólise.....82

FIGURA 35. Gráfico Pareto para a concentração de açúcares redutores nos hidrolisados de bagaço de mandioca submetidos à concentração de ácido, tempos e temperatura de hidrólise variáveis, referente à planificação experimental 2.....86

FIGURA 36. Superfície de resposta da concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da concentração de HCl utilizada e do tempo de hidrólise.....88

FIGURA 37. Gráfico de contorno da concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da concentração de HCl utilizada e do tempo de hidrólise.....89

FIGURA 38. Superfície de resposta para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da temperatura e da concentração de HCl utilizada na hidrólise.....90

FIGURA 39. Gráfico de contorno para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da temperatura e da concentração de HCl utilizada na hidrólise.....90

FIGURA 40. Superfície de resposta para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da temperatura e do tempo de hidrólise.....91

FIGURA 41. Gráfico de contorno para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da temperatura e do tempo de hidrólise.....91

FIGURA 42. Comparação entre os hidrolisados ácido e enzimático de bagaço de mandioca, com relação à sua influência no consumo de açúcar redutor e produção de biomassa e de goma xantana..95

FIGURA 43. Resultado da fermentação com o hidrolisado de casca de café suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio.....97

FIGUR 44. Resultado da fermentação com o hidrolisado de casca de café suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio após detoxificação com carvão ativo.....98

FIGURA 45. Goma xantana produzida na fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca, misturado com o hidrolisado de casca de café. (1) 100% de hidrolisado de bagaço de mandioca, (2) 75% de hidrolisado de bagaço de mandioca, (3) 50 % de hidrolisado de bagaço de mandioca, (4) 25 % de hidrolisado de bagaço de mandioca, (5) 100% de hidrol. de casca de café...101

FIGURA 46. Fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com

concentração inicial de açúcar redutor de 48,56 g/L, utilizando a *X. campestris*, para produção de goma xantana.....103

FIGURA 47. Fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 40,36 g/L, utilizando a *X. campestris*, para produção de goma xantana.....104

FIGURA 48. Fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 24,42 g/L, utilizando a *X. campestris*, para produção de goma xantana.....105

FIGURA 49. Fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 19,82 g/L, utilizando a *X. campestris*, para produção de goma xantana.....106

FIGURA 50. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 19,45 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio.....108

FIGURA 51. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 18,77 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, e peptona como fonte de nitrogênio.....109

FIGURA 52. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 19,54 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, e nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.....110

FIGURA 53. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 21,05 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....111

FIGURA 54. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 18,77 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, e uréia como fonte de nitrogênio.....113

FIGURA 55. Goma xantana produzida na fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca, suplementado com fontes alternativas de nitrogênio. (1) extrato de levedura, (2) peptona, (3) nitrato de potássio, (4) sulfato de amônio, (5) uréia.....121

FIGURA 56. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio.....122

FIGURA 57. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com peptona como fonte de nitrogênio.....122

FIGURA 58. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.....123

FIGURA 59. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....123

FIGURA 60. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com uréia como fonte de nitrogênio.....124

FIGURA 61. Determinação da viscosidade da solução de goma xantana comercial em NaCl 0,1 M.....124

FIGURA 62. Espectro de IV das amostras de goma xantana obtidas por fermentação com fontes alternativas de nitrogênio e da amostra comercial de goma xantana da Kelco.....126

FIGURA 63. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 19,36 g/L, com a

bactéria *Xanthomonas campestris*, em fermentador com capacidade de 8 L., usando nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.....129

FIGURA 64. Velocidades específicas de consumo de substrato, de formação de produto e de biomassa, na fermentação para produção de goma xantana em fermentador de 8 L.....133

FIGURA 65. Fermentador de 8L em operação na produção de goma Xantana.....134

FIGURA 66. Ciclone do secador-pulverizador, mostrando a goma xantana seca.....135

FIGURA 67. Secador-pulverizador de laboratório em operação.....136

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Teores de amilose e intervalos de geleificação de amidos de algumas fontes vegetais.....13

TABELA 2. Comparação da composição de xantana obtida a partir de uma variedade normal e uma sub-variedade de *X. campestris*.....20

TABELA 3. Graus de substituintes acetil e piruvil para várias amostras de goma xantana comercial.....20

TABELA 4. Meios básicos de crescimento e de produção usados para a *Xanthomonas Campestris*.....50

TABELA 5. Variáveis experimentais usadas no planejamento fatorial para a determinação das condições ótimas de auto-hidrólise da casca de café.....54

TABELA 6. Valores das variáveis experimentais usadas no planejamento fatorial para determinação das condições ótimas de auto-hidrólise de bagaço de mandioca.....58

TABELA 7. Composição básica do substrato usado nas fermentações com hidrolisado de casca de café e de bagaço de mandioca.....62

TABELA 8. Proporção de mistura dos hidrolisados de casca de café e de bagaço de mandioca.....63

TABELA 9. Características Físico-Químicas da casca de café utilizada, em g/100g de matéria seca.....76

TABELA 10. pH dos hidrolisados de casca de café antes e depois do tratamento térmicos realizados.....78

TABELA 11. Concentração de açúcar redutor em g/L nos hidrolisados obtidos no tratamento térmico da casca de café.....79

TABELA 12. ANOVA para a concentração de açucares redutores recuperados da casca de café no planejamento experimental 1..81

TABELA 13. Composição centesimal do bagaço de mandioca (g/100 g)..... 84

TABELA 14. Planificação experimental para otimizar as condições físicas de hidrólise ácida do bagaço de mandioca para a recuperação de açúcares..... 85

TABELA 15. ANOVA para a concentração de açucares redutores recuperados do bagaço de mandioca no planejamento experimental 2..... 87

TABELA 16. Preços e produtos químicos para a hidrólise ácida de 150 kg de bagaço de mandioca..... 93

TABELA 17. Preços e produtos químicos para a hidrólise enzimática de 150 kg de bagaço de mandioca..... 94

TABELA 18. Resultados das análises de cafeína e taninos nos hidrolisados de casca de café com e sem detoxificação com carvão ativo..... 99

TABELA 19. Resultados da fermentação com as misturas de hidrolisado de casca de café e de bagaço de mandioca..... 100

TABELA 20. Parâmetros inicial e final, com os fatores de conversão de substrato em biomassa e em goma xantana, calculados a partir dos dados levantados na cinética da fermentação com a *Xanthomonas campestris* do hidrolisado de bagaço de mandioca com as várias fontes de nitrogênio testadas..... 114

TABELA 21. Parâmetros cinéticos das fermentações realizadas a *Xanthomonas campestris*, com o hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com fontes alternativas de nitrogênio..... 116

TABELA 22. Velocidades específicas do processo de produção de goma xantana na fase exponencial de crescimento..... 118

TABELA 23. Velocidades específicas do processo de produção de goma xantana na fase estacionária de crescimento..... 119

TABELA 24. Viscosidade medida das soluções preparadas com as gomas xantanas comercial e produzidas pela *Xanthomonas campestris*, com as fontes de nitrogênio testadas..... 125

TABELA 25. Variação do pH do meio de fermentação na produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*.....130

TABELA 26. Parâmetros inicial e final, com os fatores de conversão de substrato em biomassa e em goma xantana, calculados a partir dos dados levantados na cinética da fermentação com a *Xanthomonas campestris* do hidrolisado de bagaço de mandioca em fermentador de 8 L..... 131

TABELA 27. Parâmetros cinéticos das fermentações realizadas a *Xanthomonas campestris*, com o hidrolisado de bagaço de mandioca com nitrato de potássio em reator de 8 L.....132

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FDA	Food and Drug Administration
g	grama
g/L	grama por litro
g/L.h	grama por litro por hora
h	horas
°C	graus centígrados
L	litros
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
M	concentração molar
min.	minutos
N	concentração normal
N.R.R.L.	Northern Regional Research Laboratories
%	porcentagem
rpm	rotações por minuto
UNIVALI	Universidade do Vale do Itajaí
X.	*Xanthomonas*

RESUMO

Resíduos agroindustriais, como casca de café e bagaço de mandioca, são importantes fontes de carbono para processos fermentativos. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca produzindo na safra 1999/2000 22,9 milhões de tonelada, e o maior produtor mundial de café produzindo em 1998 mais de 1,6 milhões de toneladas de grãos de café. O processamento da raiz de mandioca para obtenção da fécula ou amido gera como resíduo sólido, o bagaço de mandioca, que pode ser utilizado como ração animal ou descartado. A casca de café é o resíduo do beneficiamento das cerejas café para a obtenção dos grãos. Estes resíduos podem ser utilizados na forma sólida em processos de compostagem ou fermentação no estado sólido, ou na forma de seus hidrolisados, compostos basicamente dos açúcares solúveis presentes nos resíduos. Goma xantana é um exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris,* por fermentação da glicose, com diversas aplicações na indústria química, têxtil, de tintas, cerâmicas, além de vasta aplicação na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos, na fabricação de geléias, pudins, temperos, enlatados, congelados e bebidas. O trabalho desenvolveu um processo para a obtenção da goma xantana utilizando o hidrolisado de resíduos agroindustriais (Patente SOCCOL, C.R., et all, 2000). Foram definidas as condições de hidrólise do amido presente no bagaço de mandioca, e das cascas de café, para a obtenção dos hidrolisados, temperatura de 120°C, tempo de hidrólise de 10 minutos e para o bagaço de mandioca, concentração de ácido clorídrico de 1%. A concentração de 20 g/L de glicose, obtida na hidrólise de bagaço de mandioca, foi a melhor para o processo e o nitrato de potássio, a melhor fonte de nitrogênio dentre os testados, extrato de levedura, peptona, nitrato de potássio, sulfato de amônio e uréia, com uma produção de goma xantana de 14,03 g/L, com um fator de conversão de substrato em produto de 76,42%. Análises de absorção na região do infra-vermelho das gomas produzidas com as fontes de nitrogênio testadas e a goma xantana comercial, mostraram a semelhança dos produtos, e análises reológicas mostraram que a goma xantana produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca e nitrato de potássio é semelhante á goma xantana comercial.

ABSTRACT

Cassava root is the third starch source of the world, with a production of 150 millions tons of roots. Brazil is the second world producer; cassava roots national production at 1999/2000 was estimated by IBGE(Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) in 22,9 millions tons. This production is destinated to the industries of cassava meal, starch and deriveds, as far as the consumption "in natura". The activities along the cassava roots industrialization, origin a very important solid residue; this residues, cassava bagasse, rich in starch, not extracted during the processment, is used in part as animal feed, and in part is discharged at the environment, causing hard pollution problems (IPARDES, 1986). Xanthan gum is a polysaccharide exocellular produced industrially by the bacteria *Xanthomonas campestris,* fermenting glucose, with many applications at textiles industries, paints, and a very important applications in food industries to produce jams, sauces, drinks, flans, etc. (WHISTLER, 1973). This work presented, develops a process to the production of xanthan gum using the cassava bagasse hydrolysate (Patent SOCCOL, C.R., et all, 2000). The first part of the work was the optimization of the hydrolysis condition of the residual starch presented at the cassava bagasse to obtain the hydrolysate composed basically of glucose. Then it was done the optimization of the substrate composition to the fermentation. The best glucose concentration was 20 g/L and the best nitrogen source to the process among those tested, yeast extract peptone, potassium nitrate, ammonium sulfate and urea, was potassium nitrate. It was done reological analysis and of absorption at the infra-red region of the gums produced with the nitrogen sources tested and the results were similar to the data obtained of the analysis done with the commercial xanthan gum. So this work intended to add value to this Brazilian agro industrial residue, and contribute to decrease the environmental pollution with the reuse of a residue. Besides it is present an alternative to decrease the xanthan gum productions costs.

1. INTRODUÇÃO

A fermentação submersa, sólida ou semi-sólida é um método atualmente utilizado na produção industrial de muitas biomoléculas de grade valor comercial.

Desde a década de 80, existe um grande envolvimento de autoridades e governos em âmbito mundial, no sentido de minimizar perdas e desperdícios no setor produtivo industrial, como meio de diminuir custos de produção, otimizar o uso de recursos naturais e principalmente controlar a poluição ambiental. O aproveitamento de resíduos agrícolas, industriais, agroindustriais e domésticos tem sido uma ação importante para se atingir esta meta (IPARDES, 1986).

A utilização de resíduos agro-industriais em bioprocessos permite obter substratos alternativos de baixo custo para processos fermentativos, além de auxiliar na resolução de problemas ambientais graves. No mundo, em vários laboratórios e institutos de pesquisa, têm sido desenvolvido muitos processos utilizando resíduos agroindustriais na obtenção de produtos de alto valor comercial, como etanol, cogumelos comestíveis, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários e outros. No Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de viabilizar substratos alternativos para processos biotecnológicos, na obtenção de produtos de alto valor comercial. Entre eles podemos citar a produção de etanol a partir de batata refugo (MACARI, 1996), hormônios vegetais, como a giberelina (MACHADO, et al.l, 1999; MACHADO, 1999), aromas (BRAMOSKI, 1996; MEDEIROS, 1998; SOARES, 1998.), cogumelos comestíveis (BEUX, 1995; TONIAL, 1997; FAN, 1999) a partir de casca de café; ácidos orgânicos tais como o ácido cítrico (KOLICHESKI, 1995), o ácido fumárico (CARTA, 1998; SOCCOL, 1994,) produzidos a partir de bagaço de mandioca; o ácido lático

(WOICIECHOWSKI, 1997) produzido a partir de hidrolisados de cavacos de madeira obtidos no processo de explosão a vapor.

SOCCOL, et al., 1994a; SOCCOl, 1994b; YANG, et al., 1995, PANDEY, et al., 2000 descrevem a produção de vários ácidos orgânicos, metabólitos secundários e outros, a partir de substratos como o bagaço de mandioca, casca de café, bagaço de maçã, cavacos de madeira, resíduos de batata, entre outros.

A produção comercial da goma de xantana é feita tradicionalmente através da fermentação de xarope de glicose, com bactérias da espécie *Xantomonas campestris*, sendo assim uma biomolécula produzida por processo fermentativo.

Acredita-se também poder obter viabilidade de produção de goma de xantana em fermentação submersa, utilizando como substrato, hidrolisados de materiais de natureza celulósica ou amilácea, basicamente resíduos de agroindústrias, tais como além casca de café, onde além de extrativos da fruta, existe uma alta concentração de açúcares solúveis, diretamente fermentescíveis, principalmente, frutose e glicose, também xaropes de açúcares que podem ser obtidos por hidrólise ácida ou enzimática de batata ou de refugo de batata, de mandioca, farinha de mandioca ou do bagaço de mandioca (resíduos do processamento industrial de mandioca). Estes xaropes de açúcar, os hidrolisados, contém basicamente maltose e glicose provenientes da hidrólise do amido presente na batata e na mandioca, ou nos resíduos do seu processamento industrial e constituem quando complementado convenientemente com sais e micronutrientes, um substrato alternativo viável para a produção da goma xantana por fermentação submersa.

Ainda não se conhece uma produção economicamente viável de goma de xantana por fermentação de substratos alternativos.

Entende-se que para viabilizar qualquer processo produtivo industrial é necessário baixar os custos da matéria prima e de produção sem prejuízo da qualidade do produto final. Uma alternativa é a utilização de substratos baratos, desde que atendam as características necessárias. Substratos alternativos tem sido estudados em todo o mundo na tentativa de diminuir os custos de produção da goma

xantana. YOO, & HARCUM, 1999 fizeram estudos utilizando o meio de fermentação para a produção de goma xantana baseado em sacarose suplementado com proporções crescentes de resíduo de polpa de beterraba. Os testes mostraram que, o resíduo de polpa de beterraba é potencialmente interessante para a produção de goma xantana de grau não alimentício e o rendimento da fermentação foi semelhante quando comparado à fermentação em meio base sacarose.

LÓPEZ, et al., 2001, testaram várias cepas de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana a partir de resíduos aquosos de moinho de oliva. Este resíduo é uma fonte poluidora de grandes proporções na área do Mediterrâneo. Com alta DBO e cor, tem o seu reuso altamente restrito devido á presença de ácidos fenólicos simples e polimerizados, que claramente inibiram o crescimento de algumas cepas da bactéria e a produção de goma xantana, outras cepas testadas foram mais resistentes e adaptáveis, mas a resposta de produção de goma xantana ficou prejudicada.

PAPI, R. M. et al., 1999, utilizou uma variedade selvagem de *Xanthomonas campestris* para produzir goma xantana a partir de polpa de pêssego suplementada com diversos sais, mas a produção de goma xantana foi de apenas 0,1 a 0,2 g/L.

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um processo alternativo de produção de goma xantana, utilizando como substrato da fermentação hidrolisados de resíduos agroindustriais, agregando valor comercial a um resíduo industrial, com alto grau poluídos se disposto na natureza. Por outro lado, um substrato com custo zero, já que se trata de um resíduo industrial, concorreria para diminuir consideravelmente os custos operacionais do processo fermentativo de produção da goma xantana (SOCCOL, et al., 2000).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Reaproveitamento de Resíduos

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 como exemplo, o bagaço de cana e de mandioca, a palha de cereais, o bagaço de laranja, a polpa de maça, o caule e o sabugo de milho, a serragem, cavacos de madeira e outros resíduos de atividades florestais, além de diversos tipos de papeis 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.

Desde os anos 80, nota-se um grande interesse mundial de governos e indústrias no reaproveitamento tanto de resíduos industriais quanto de resíduos agrícolas, existindo ainda a preocupação com as condições sanitárias e de poluição ambiental.

Inúmera pesquisa tem sido feitas com o objetivo de ampliar as possibilidades de reaproveitamento de resíduos de agroindústrias, que atuam nos mais variados campos de atividades. A biotecnologia e a definição de processos biotecnológicos tem se mostrado uma ferramenta importante nesta tarefa de reduzir a poluição ambiental ao mesmo tempo em que agrega valor a resíduos de processos industriais, produzindo matérias primas alternativas e baratas, para processos industriais.

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos permite obter substratos alternativos para processos fermentativos, barateando custos de produção e reduz a poluição ambiental, auxiliando assim na resolução de problemas tais como o tratamento e a disposição de resíduos.

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. Uma das linhas de pesquisa, viabilizar substratos alternativos para processos biotecnológicos, na obtenção de produtos de alto valor comercial, mostra de maneira clara a viabilidade de alguns substratos para processos fermentativos, com a produção de biomoléculas importantes a partir de resíduos agroindustriais. Como exemplo podem ser citados, hormônios vegetais, como a giberelina (MACHADO, et al., 1999; MACHADO, 1999), aromas (MEDEIROS, 1998; SOARES, 1998; BRAMOSKI, 1996.), cogumelos comestíveis (BEUX, 1995; TONIAL, 1997; FAN, 1999), ácidos orgânicos tais como o ácido cítrico (KOLICHESKI, 1995), o ácido fumárico (CARTA, 1998; SOCCOL, 1994), o ácido lático (WOICIECHOWSKI, 1997; SOCCOL, 1994a; SOCCOl, 1994b). Estes estudos além de agregar valor a resíduos agroindustriais, contribuem para minimizar a poluição ambiental, e baratear processos produtivos de biomoléculas já que definem processos com matérias-primas mais baratas.

2.2 A agroindústria cafeeira

De acordo com PANDEY et al., 2001 e com a Organização Internacional do Café (ICO, 1998), a agroindústria cafeeira é uma das mais importantes do mundo. *Coffea arábica* e *Coffea Robusta* são duas das principais variedades do gênero cultivadas no mundo, produzindo anualmente mais de seis milhão de toneladas de café beneficiado em mais de 50 países.

O Brasil é o maior produtor mundial de café, produzindo em 1998 mais de 1,6 milhões de toneladas de grãos de café, o que representa cerca de 27,5% do total da produção mundial; o Paraná, sozinho, produziu 278 mil toneladas, sendo o quarto produtor nacional de café. A Colômbia produziu 652,4 mil toneladas de café beneficiado correspondendo a cerca de 10,8% do total da produção mundial (ICO, 1998).

As figuras 1 e 2, mostram o cafeeiro com as cerejas de café em diferentes

fases.

As cerejas de café se tornam cor vermelha intenso quando maduras. Em geral, no Brasil o amadurecimento dos frutos se dá nos meses de abril a maio.

Conforme BRESSANI, 1979, cereja madura é formada pelas seguintes partes: casca (exocarpo); mucilagem ou goma (mesocarpo); pergaminho (endocarpo); película prateada (revestindo o grão de café); grão de café (endosperma); embrião aproximadamente 5 mm de espessura, rico em açúcares e pectinas. Os grãos de café são revestidos por uma dupla membrana, o pergaminho de cor amarelada e de consistência dura e frágil, e a película prateada, muito mais fina e aderida ao grão.

O processo de beneficiamento do café pode ser feito por via seca ou por via úmida.

O fluxograma do processamento das cerejas de café está mostrado na figura 3.

FIGURA 1. Os frutos do cafeeiro.

Figura 2. Os vários estágios das cerejas de café.

O processamento por via seca consiste basicamente na colheita, lavagem e secagem da fruta nos terreiros de café ou em secadores, produzindo os "coquinhos", estruturas onde a semente fica solta dentro da polpa seca que ainda a envolve.

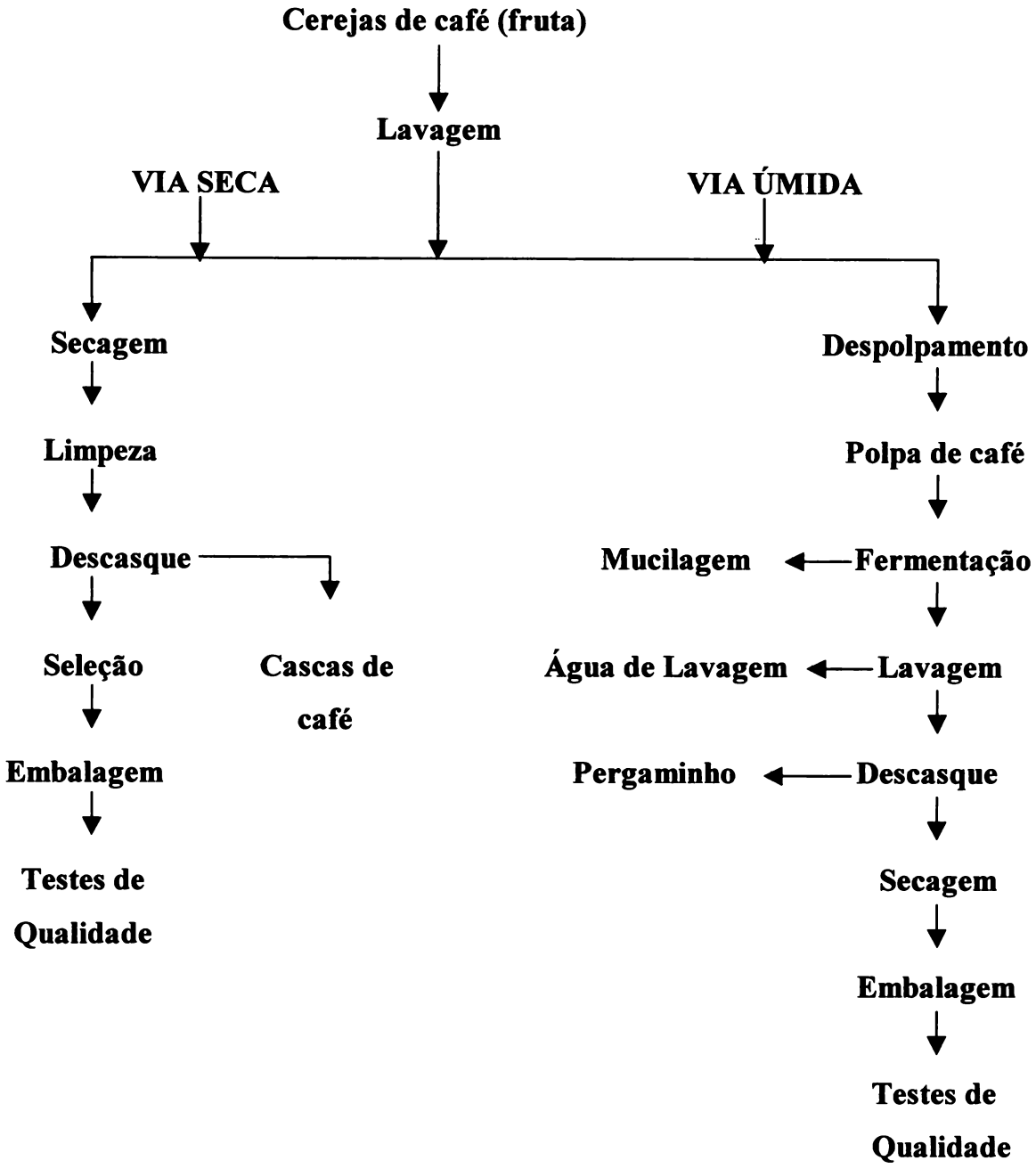


FIGURA 3. Fluxograma do processamento via seca e via úmida das cerejas de café mostrando os pontos onde são gerados os resíduos sólidos e líquidos.
Fonte: PANDEY et al., 2001.

Depois da secagem o café passa por uma etapa de limpeza, onde os grãos são separados das impurezas (pedras, terras, folhas, galhos, etc.) através de peneiras vibratórias. O café limpo e seco é então descascado, etapa que consiste na quebra da

casca seca dos coquinhos e separação mecânica do resíduo, a polpa seca, da semente propriamente dita.

Assim os tecidos secos do epicarpo, mesocarpo e endocarpo que envolvem a semente são quebrados e separados destas. As sementes seguem para seleção e empacotamento.

No processo por via úmida, após a lavagem as cerejas de café são despolpadas, processo que consiste em separar a polpa da fruta da semente, gerando, após a fermentação um resíduo sólido chamado de mucilagem. Em seguida, as sementes são lavadas produzindo um resíduo líquido, a água de lavagem. Após as sementes são descascadas produzindo um resíduo sólido composto basicamente do pergaminho, umas finas pele que recobre as sementes. Na seqüência as sementes são secadas e embaladas.

Ambos os processo são largamente usados no mundo, e ambos apresentam vantagens e desvantagens. O processo via úmida gera um produto mais uniforme em termos de grau de maturação da fruta, já que somente as frutas mais maduras são despolpadas. Em contra partida, a poluição hídrica é muito mais agressiva do que a poluição produzida no processo via seca, que gera resíduo sólido. Por outro lado, no processo via seca não há a seleção dos frutos com grau semelhante de maturação.

2.2.1 Resíduos da Agroindústria Cafeeira

No processo de beneficiamento do café por via seca, a casca constitui o principal resíduo da industrialização, representado cerca de 50 % em massa do café seco. Este resíduo praticamente não é aproveitado, sendo deixado em pilhas perto das fazendas, causando um sério problema ambiental. (MATIELLO, 1991; CARDOSO, 1994).

No processo de beneficiamento por via úmida, a polpa da fruta madura é removida em meio aquoso, liberando a semente que é então secada ao ar livre ou em secadores, torrada e moída. O resíduo aquoso do processo de despolpação contém a polpa e a casca da fruta, constituindo em um resíduo aquoso com alto teor de sólidos suspensos, alto teor de matéria orgânica diretamente fermentescível composta

basicamente pelos açúcares solúveis presentes na polpa da fruta, sendo, portanto um resíduo líquido extremamente poluidor e que praticamente não é aproveitado.

O descarte, ou seja, a simples disposição no meio ambiente da casca de café ou da polpa de café (Biopulca) resulta no desperdício de uma biomassa que poderia ter grande utilidade devido a seu grande volume, alta biodegradabilidade, alto conteúdo de matéria orgânica diretamente fermentescível e seu potencial como fonte de alimentação para animais. Além disso, o descarte deste material, devido às suas características peculiares acima mencionadas, causa um grave problema de poluição ambiental.

2.2.2 Utilização dos Resíduos da Agroindústria cafeeira

Para a utilização deste resíduo sólido, a casca como ela é gerada, é necessário resolver o problema dos Compostos Tóxicos Recalcitrantes (RTC) como a cafeína, taninos e polifenóis que representam uma forte limitação no uso da polpa de café como fonte alimentar animal, sendo também grandes poluentes agroindústrias nos países produtores de café (SEAB/DERAL – Secretaria de Abastecimento do Estado do Paraná).

Estudos para a detoxificação da casca de café para que possa ser utilizada como ração animal tem sido feitos. BRAND, 1999, em estudos de fermentação utilizando os fungos *Rhizopus arrhizus, Aspergullus sp* e *Phanerochaete crisosporium*, conseguiu eficiências de redução de taninos de 65% e de cafeína de 87%, taninos 65% e cafeína 92% e taninos 45% e cafeína de 70,8% respectivamente.

A outra alternativa de utilização deste resíduo, e fazer a sua hidrólise, que consiste no tratamento térmico do resíduo com ou sem a utilização de agentes químicos.

A hidrólise da casca de café produz duas frações: uma fração aquosa composta basicamente de açúcares e outros compostos solúveis presentes na polpa do café, além de açúcares derivados da hemicelulose da casca; e uma fração sólida composta basicamente de celulose e lignina não solúveis, e açúcares residuais do processo de extração.

Em média, cada tonelada de café torrado e moído produz uma tonelada de polpa de café seca que, devido ao volume, conteúdo de matéria orgânica e nutrientes, pode ser usada em processos fermentativos como substrato, na forma líquida, na forma sólida, ou na forma hidrolisada. A hidrólise térmica da biomassa ligno-celulósica é um pré-tratamento utilizado para separá-la eficientemente em seus componentes básicos. Temperatura e tempo de pré-tratamento são variáveis que devem ser otimizadas no pré-tratamento.

2.3 A agroindústria de Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta bastante cultivada em países de clima tropical. De acordo com PANDEY, et al., 2001, a cultura da mandioca é a sexta cultura mais importante do mundo e é básico para mais de 700 milhões de pessoas em muitos países. O Brasil é o segundo maior produtor do mundial, com uma produção que em 1997 chegou a 24,3 milhões de toneladas, contra 31 milhões de toneladas produzidas pela Nigéria, o maior produtor mundial. De acordo com dados do SEAB-DERAL – Secretaria de Abastecimento do Estado do Paraná, na safra de 1997 o Paraná produziu 3,2 milhões de toneladas de mandioca. Uma parte da produção de mandioca é destinada à obtenção de farinha, usada diretamente no consumo alimentar e o restante é destinado à industrialização, que consiste basicamente na extração de amido.

A legislação brasileira é uma das poucas do mundo a distinguir a fécula do amido. Através destas normas, considera-se amido a fração extraída da parte aérea das plantas e fécula a fração amilácea extraída de raízes, tubérculos e rizomas (LIMA, 2001).

A figura 4, mostra a raiz da mandioca.

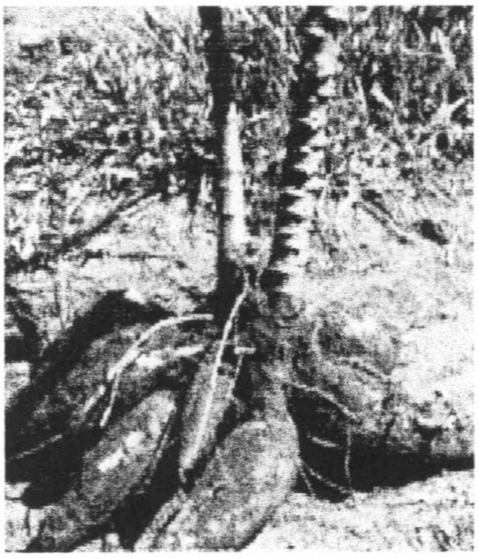


FIGURA 4. Raiz da mandioca.

O processo produtivo de extração da fécula está mostrado na figura 5.

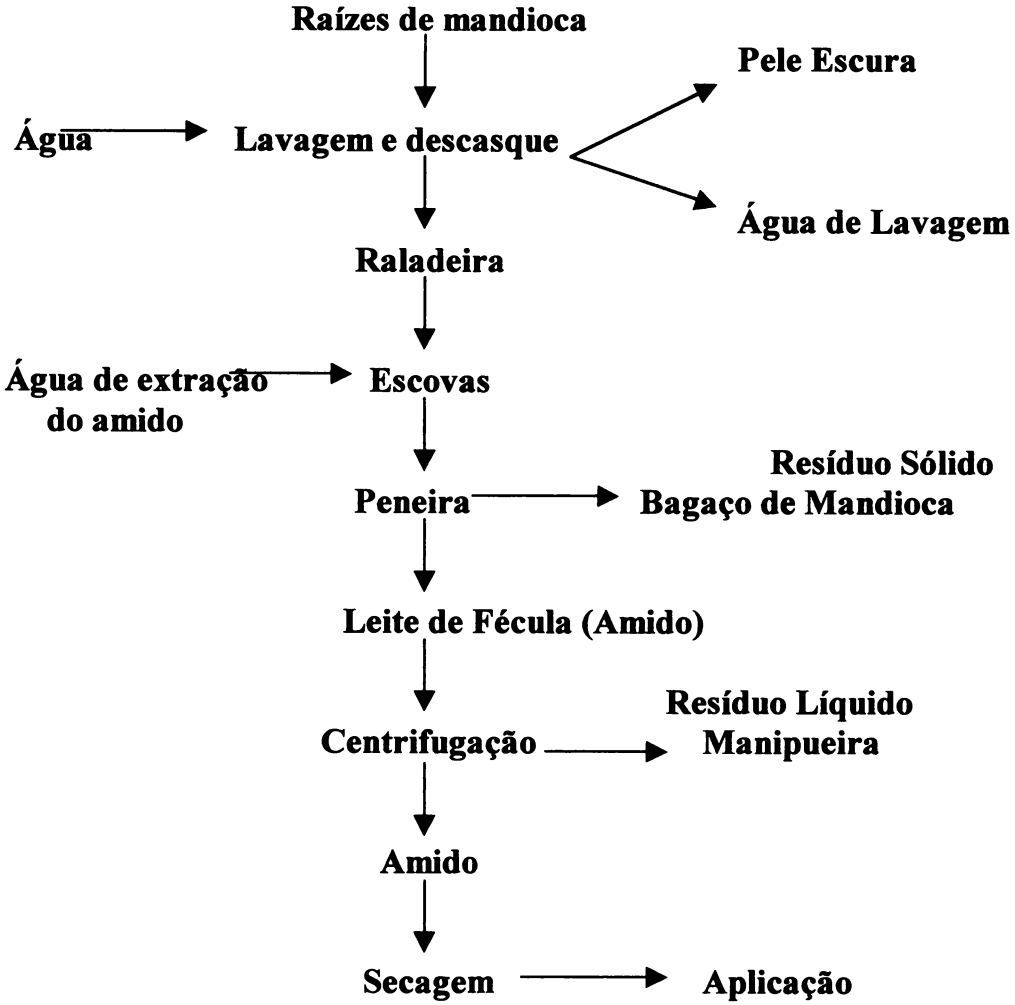


FIGURA 5. Fluxograma do processamento industrial das raízes de mandioca para a obtenção da fécula, mostrando onde é gerado o bagaço de mandioca.
Fonte: PANDEY et al., 2001.

2.3.1 O Resíduo da Agroindústria da Mandioca

As indústrias que processam a mandioca com o objetivo de extrair a fécula, produzem diariamente milhares de toneladas de bagaço de mandioca, resíduo deste

processamento. O bagaço é composto basicamente de fibras provenientes das raízes e do amido que não foi extraído. O teor de amido deste bagaço varia entre 50 e 70%, e é descartado. O bagaço possui uma grande capacidade de absorção de água, podendo conter até 75% de umidade.

2.3.2 Utilização dos Resíduos da Agroindústria da mandioca

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, pode ter empregos biotecnológicos, usado como substrato na produção de biomassa microbiana, além de metabólitos primários ou secundários em processos fermentativos.

2.4 O amido

A fécula de mandioca apresenta cerca de 18% de amilose e 82% de amilopectina, expressos sobre o total de amido. No amido de cereais, ocorrem esses mesmos polímeros, mas em proporções diferentes (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

O amido é um polímero de elevado peso molecular, de maior abundância na natureza, após a celulose. Quimicamente o amido, a fécula e a celulose são polímeros de unidades de glicose, unidas por ligações glicosídicas. Enquanto no amido as ligações ocorrem na forma α, na celulose ocorrem na forma β. As ligações do tipo α são mais facilmente hidrolisadas que as do tipo β, o que torna o uso do amido potencialmente mais interessante como substrato de processos biossintéticos (LIMA et al., 2001). Do ponto de vista estrutural, amido é um homopolissacarídeo neutro formado por duas estruturas químicas: amilose e amilopectina. Dependendo da fonte vegetal, estas duas estruturas se apresentam em proporções diferentes, conforme exemplificado na tabela 1, o que resulta em propriedades diferentes

TABELA 1. Teores de amilose e intervalos de geleificação de amidos de algumas fontes vegetais.

Amido	% amilose	Intervalo de Geleificação (°C)
Mandioca	10/18	51 - 63
Milho	25/27	62 - 71
Arroz	16/18	61 - 77
Batata	18/22	56 - 62
Trigo	24	58 - 64

Fonte: BOBBIO & BOBBIO, 1995; 2001.

Conforme BOBBIO & BOBBIO, 1995, A amilose é um polissacarídeo composto de unidades de D-glucopiranose unidas por ligações glicosídicas α-1,4 em número que variam de 200 a 10.000, formando uma cadeia linear que no espaço produzem estruturas em forma helicoidal. A amilopectina constitui a fração ramificada do amido. É formada por unidades de D-glucopiranose unidas por ligações glicosídicas α-1,4. Em intervalos de aproximadamente 20 a 25 unidades de glicose, da cadeia forma-se uma ligação glicosídica α-1,6 produzindo uma ramificação, dando origem a uma estrutura espacial altamente ramificada e volumosa. Esta estrutura embora não perfeitamente estabelecida, confere à amilopectina uma forma esférica.

De acordo com BOBBIO & BOBBIO, 2001, há possibilidade de existirem ramificações em quantidades muito pequenas também na amilose. Na amilopectina, a proporção numérica de ligações 1,6 e 1,4 é de aproximadamente 1:20, ou seja, de 4 a 5 % do total de ligações glicosídicas. O tamanho das cadeias ramificadas da amilopectina é variável, mas normalmente as estruturas apresentam alto peso molecular.

Comparando-se as estruturas de amilose e amilopectina hidratadas, a primeira mantém uma estrutura estabilizada pela água em forma espiralada, em cujas voltas podem-se acomodar átomos de iodo, dando a conhecida coloração azulada, enquanto

que a amilopectina deverá parecer arredondada (BOBBIO & BOBBIO, 2000; ARAÚJO, 1999).

As moléculas de amilose e amilopectina estão agrupadas em grânulos cuja forma, tamanho e regiões cristalinas são suficientemente diferenciadas para possibilitar a identificação da origem do amido.

2.5 Processos de Hidrólise

Polímeros vegetais naturais são matérias-primas viáveis para processos de hidrólise, com o objetivo de produzir caldos onde se tem dissolvido ou em suspensão os monômeros ou as unidades básicas formadoras do polímero vegetal.

Madeira, celulose, amido são exemplos de materiais poliméricos que podem ser hidrolisados com o objetivo de separar os seus componentes, ou as unidades básicas de cada componente do material como um todo.

Vários métodos têm sido propostos para hidrolisar a madeira, separando os seus componentes básicos, a celulose, a hemicelulose e a lignina, tais como tratamentos químicos em meio ácido ou básico seguida de um tratamento térmico de maior ou menor intensidade, por tempos determinados. O sucesso de cada tratamento está relacionado com a quantidade de material recuperado após a etapa de pré-tratamento e ao grau no qual a hidrólise enzimática da celulose, uma das frações recuperadas, é conseguida (GRETHLEIN, 1984; WOOD & SADDLER, 1988; PARISI, 1989).

A hidrólise, ácida ou enzimática de amidos de várias fontes tem sido estudas com o objetivo de se determinar as condições operacionais ótimas do processo. A hidrólise enzimática do amido de mandioca foi estuda por CARTA, 1999, e a hidrólise ácida foi estudada por WOICIECHOWSKI, et al., 2001, com um rendimento de produção de glicose em na faixa de 97% para a hidrólise enzimática e de 95% para a hidrólise ácida.

2.6 A bactéria *Xanthomonas campestris*

As *Xanthomonas* são bactérias que produzem necrose em vegetais. As maiores parte das espécies, formam colônias amarelas, poucas produzem colônias esbranquiçadas ou de cor creme. São células normalmente monotríqueas.

Nos cultivos em ágar produzem um pigmento amarelo insolúvel em água. No ágar com extrato de carne desenvolvem com pouca freqüência uma cor parda difusa. Em geral digerem com facilidade as proteínas.

Comumente alcalinizam o leite, e desprendem H_2S como resultado do seu metabolismo. Produzem ácidos a partir de monossacarídeos ou dissacarídeos, e principalmente são patógenas de vegetais, causando necroses em plantas, variedades de *Xanthomonas*, infectam um grnade número de plantas de interesse agrícola, incluindo alfafa e feijão (PELCZAR & REID 1966; GACIA-OCHOA, et al., 2000)

A figura 6, mostra a bactéria *Xanthomonas campestris.*

FIGURA 6. A bactéria *Xanthomonas campestris.* Micrografia(x12.000). FONTE: GARCIA-OCHOA, et al., 2000).

Segundo PELCZAR & REID, 1966, a bactéria *Xanthomonas campestris* tem a seguinte classificação:

Phylum	*Bactéria*
Classe	
Ordem	*Pseudomonadales*
Família	*Pseudomonadaceae*
Gênero	*Xhantomonas*
Espécie	*campestris*

Os membros da família se caracterizam claramente por formas alongadas de longitude curta ou média. São gram negativas com um flagelo ou grupo de flagelos, não esporuladas, aeróbias e heterotríficas. Muitas espécies são encontradas na antureza e habitam comumente o solo e a água. Os representantes mais conhecidos são as *Pseudomonas,* as *Xanthomonas* e as *Acetobacter.*

2.7 A Goma Xantana

O termo polissacarídeo é utilizado para designar os polímeros de carboidratos que, geralmente contém estruturas repetidas periodicamente, ligadas por ligações predominantemente, mas não necessariamente, glicosídicas,. São macromoléculas encontradas naturalmente como estruturas constituintes de grande quantidade de organismos vivos, animais e vegetais, onde exercem a função de proteção, suporte, resistência mecânica e elasticidade de tecidos (MATHEWS, 1975; YALPANI & SANDFORD, 1988).

Xantana ou goma xantana é o nome comum de um exopolissacarídeo microbiano produzido por processo fermentativo pela bactéria *Xanthomonas campestris.* É um exopolissacarídeo complexo, produzido por fermentação pela bactéria *Xanthomonas campestris*, gram (-) e patogênica de algumas plantas. Consiste de resíduos de ácidos de D-glucosil, D-manosil e D-glucuronil, na proporção molar 2:2:1, e proporções variadas de *O*-acetil e piruvil substituintes. Devido às suas propriedades físicas, é largamente usado como espessante em indústria alimentícias ou não. A goma de xantana é também usada como

estabilizante para uma grande faixa de emulsões, suspensões e produtos espumosos (BECKER, 1998; GARCIA-OCHOA, 2000).

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

A goma xantana é portanto um polímero de carboidratos com diversas aplicações industriais dentre as quais podem ser citadas o seu uso como aditivo para a indústria têxtil, de tintas, aditivos e óleos automotivos, em coberturas cerâmicas, polidores e outros; além disso possui vasta aplicação na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos em geléias e pudins, temperos, enlatados, congelados e bebidas (McNEELY & KENNETH, 1973).

2.7.1 Origem da Goma Xantana

De acordo com KENNEDY & BRADSHAW, 1984, o polissacarídeo xantana, foi estudado pela N.R.R.L., órgão de pesquisa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, que fez nos anos 50, um trabalho intensivo para seleção de uma grande coleção de culturas de microrganismos que fossem capazes de fazer a biossíntese de produtos gomosos solúveis em água de importância comercial. Este trabalho foi feito por dois motivos: Primeiramente levou-se em conta que havia nos Estados Unidos um mercado importante para novas gomas solúveis em água, para complementar ou substituir o mercado existente de gomas naturais extraídas de algas (alginatos), árvores (goma arábica), sementes (goma de alfarrobo) e de cereais (amido), já que a maioria destes produtos derivados de plantas, tinha o fornecimento e a qualidade variável em função da estação, condições climáticas adversas, etc. Depois, devido à grande produção de amido de milho dos Estados Unidos, foi considerado que havia um grande fornecimento de matéria prima, fonte de carbono, que poderia facilmente ser usado para a conversão a xarope de glicose, usado em processos fermentativos de gomas microbianas.

2.7.2 Estrutura da Goma Xantana

Muitos estudos foram feitos para desvendar a estrutura básica da goma xantana (Figura 7.). Os primeiros estudos, feitos Por SLONEKER & JEANES, 1962, não tinham muita credibilidade devido à falta de recursos técnicos disponíveis na época para dar a representação precisa de moléculas de polímeros. Mais tarde JANSSON et al., 1975, propuseram a estrutura aceita para a goma xantana. A estrutura consiste de um esqueleto de D-glucopiranose, unidos por ligação β(1-4), semelhante à celulose, ao qual, cadeias laterais de trissacarídeos são ligadas alternando resíduos de açúcar na cadeia principal na posição C-3. As cadeias laterais consistem de dois resíduos de D-Manose e um resíduo de ácido D-glucurônico. O resíduo terminal D-manopiranose é ligado por ligação β-(1-4) ao resíduo de ácido D-glucurônico, o qual por sua vez é ligado por ligação α-(1-2) ao resíduo não terminal de D-manopiranose. Ainda, técnicas de metilação usadas por JANSSON et al., 1975, indicam grupos acetil presentes como substituintes na posição C-6 da estrutura não terminal da D-manopiranose e que grupos piruvil estão ligados por ligação acetal às posições C-6 e C-4 de aproximadamente metade dos grupos terminal de D-manopiranose (KENNEDY & BRADSHAW, 1984; CASAS et al., 2000; LEELA & SHARMA, 2000).

Da mesma forma que a estrutura proposta, uma faixa de peso molecular tem sido reportada para as moléculas de goma xantana. Em função da técnica usada, pesos moleculares de 2×10^6, 13×10^6, 50×10^6 ou ainda 62×10^6 foram obtidos. Variações nas condições de fermentação usadas na produção da goma xantana é outro fator que pode influenciar no peso molecular do polissacarídeo (KENNEDY & BRADSHAW, 1984).

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.

De acordo com KENNEDY & BRADSHAW, 1984 e CASAS, 2000, a manutenção adequada da cultura utilizada é importante para a consistência da

qualidade da produção de xantana. Quando ocorre uma variação da cultura de *X. campestris*, ocorre a alteração no grau de acetilação e de piruvilação, muito embora a composição básica do esqueleto sacarídico da xantana produzida seja similar, conforme está apresentado na tabela 2.

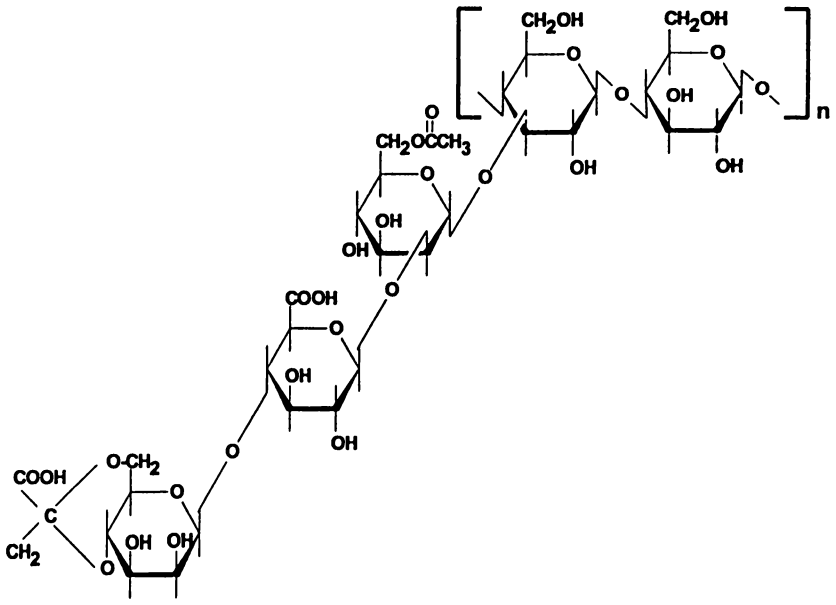


FIGURA 7. Estrutura básica proposta para o exopolissacarídeo produzido pela *X. campestris*.

FONTE: BECKER et al., 1998.

De acordo com CASAS, 2000, na goma xantana a variação de estrutura, tende a ser principalmente devido a alterações no grau de acetilação e de piruvilação. Assim, dependendo do processo de produção graus variáveis de substituintes acetil e piruvil são conseguidos. A tabela 3, mostra a variação nos graus de acetilação e de piruvilação obtidos para as gomas xantanas de diversas fontes.

De acordo com KENNEDY & BRADSHAW, 1984, estas alterações podem ser esperadas, pelas razões já mencionadas, diferentes variedades de microrganismos, variações nos meios de cultivo e na composição do meio, tendem a produzir produtos diferentes, mesmo produtos de uma mesma procedência podem apresentar variações deste tipo. Isto mostra a dificuldade em manter um padrão de qualidade na produção de goma xantana por processos fermentativos.

TABELA 2. Comparação da composição de xantana obtida a partir de uma variedade normal e uma sub-variedade de *X. campestris*.

Variedade de *X. campestris*	Composição (g/100 g)				
	D-glucose	D-manose	Ácido D-glucuronico	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.

TABELA 3. 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	0,90
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: [a]Kelco Co. Inc. (San Diego, USA), [b]Rhone-Poulenc Industries (Paris, França), [c]Lohmann Fermentatios (Cuxhaven, Alemanha).

Fonte: KENNEDY & BRADSHAW, 1984.

2.7.3 Produção

Sabe-se de longa data que muitas espécies de *Xantomonas* produzem colônias viscosas de goma. Mais de 100 espécies de *Xantomonas* têm sido relatadas nos últimos 80 anos. Das diferentes espécies relatadas, *X. campestris, X. phaseoli, X. malvacearum e X. carotae* são mencionadas como melhores produtoras de polissacarídeos extracelulares. Dos vários Polissacarídios biossintéticos, a goma xantana, produzida pela *Xantomonas campestris*, possui propriedades muito interessantes. Pode-se citar a propriedade de complementar e acentuar as

propriedades de gomas solúveis em água, naturais e sintéticas. (McNEELY & KENNETH, 1973; LEELA & SHARMA, 2000).

Usando espécies de *Xanthomonas* diferentes, e mantendo idênticas as condições de fermentação, foi detectada uma variação no grau de acetilação e piruvilação no polímero produzido, mas a composição de carboidratos mostrou apenas pequenas variações com D-glucose, D-manose e ácido D-glucurônico ocorrendo na proporção molar aproximada de 2:2:1, consistente com a estrutura aceita para a goma xantana. Duas variedades de *X. phaseoli* produziram polímeros com níveis muito baixos de substituintes, acetato e piruvato; também níveis variáveis de acetato e piruvato substituintes foram detectados quando uma cepa de *X. campestris* foi utilizada em meio com fontes alternativas de carbono. Em lugar da glicose foram utilizadas alanina, glutamato, glicerol e piruvato. Novamente a composição de carboidrato do polímero foi consistente com a estrutura aceita para a goma xantana (KENNEDY & BRADSHAW, 1984).

O método mais comum para se produzir a goma de Xanthomonas, é inocular um meio propício com a espécie de Xanthomonas escolhida, preferencialmente a *X. campestris,* e proceder a fermentação. O meio típico de fermentação para o processo contém 2 a 5% de glicose comercial, uma fonte orgânica de nitrogênio, fosfato dipotássico de hidrogênio e elementos traços. O tempo típico de fermentação é de 96 horas a 30°C em condições de aerobiose. Como fontes alternativas de nitrogênio orgânico podem ser usados, xaropes de amido de milho e resíduos secos de destilarias (LAWRENCE, 1976).

O processo típico de produção da goma xantana por fermentação está apresentado na figura 8.

Inicialmente a cepa da bactéria selecionada é preservada para manter as suas propriedades desejadas.

O crescimento do microrganismo e a produção da goma xantana desejada é influenciada por uma série de fatores como, a composição do meio, o tipo e o modo de operação do reator, se contínuo ou em batelada, as condições de cultivo, pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, etc. (GARCIA-OCHOA, et al., 2000).

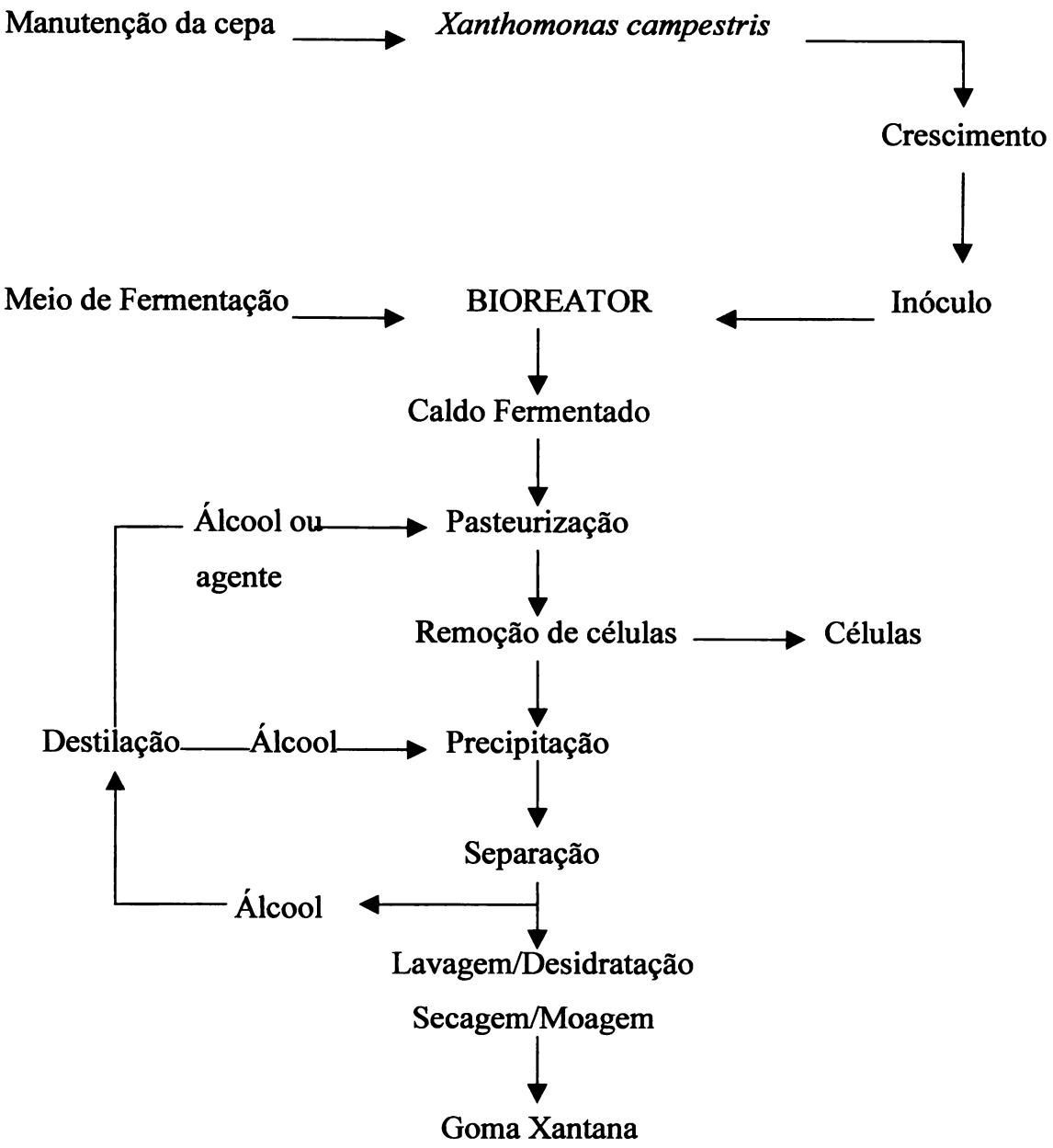


FIGURA 8. Fluxograma do processo de produção da Goma Xantana.
FONTE: GARCIA-OCHOA, et al., 2000.

2.7.3.1 Meio de fermentação

Modificações dos meios de cultivo líquido foram tentadas e patenteadas, como por exemplo, o uso de fontes alternativas de nitrogênio. Nitrogênio inorgânico

foi usado, com nitrato de amônio suplementado com uma quantidade mínima de nitrogênio orgânico; neste caso foi utilizado peptona de soja tipo T da Sheffield Chemical Co. Este meio foi usado para a fase de crescimento bacteriano por 24 horas e após o meio de fermentação contendo apenas o nitrogênio inorgânico foi utilizada para a produção do polímero. As condições de fermentação foram, em temperatura de 28 - 31°C por mais 72 horas em condições de aerobiose. Ao final da fermentação o fermentado apresentava uma viscosidade de 3.000 Cp a 25°C, medida em viscosímetro modelo LVF com spindle Nº 3 na rotação de 60 rpm. A concentração de colóide no fermentado era de 1,5% e o açúcar residual era de menos de 0,1% (LAWRENCE, 1976).

De acordo com GARCIA-OCHOA et al., 2000 e CASAS, 2000, os meios de cultivo empregados para o crescimento da *X. campestris* são meios complexos. O meio mais comumente usado é o meio YM, mas foram testadas variações semissintéticas do meio YM, designado por YM-T, com duas fontes de nitrogênio. O crescimento foi similar em ambos os meios e um rendimento máximo de biomassa foi obtido com ambos.

De acordo com PAPAGIANNI, et al., 2001, a concentração da fonte de carbono afeta a eficiência de conversão de açúcar em polissacarídeo. A concentração de glicose recomendada é de 1 a 5%, e para concentrações maiores, o rendimento de produto decresce. PAPAGIANNI, et al., 2001, usaram concentrações de glicose de 0,2% nos seus trabalhos e mesmo assim, em condições de fonte de carbono limitantes, houve uma grande produção de goma xantana, atingindo valores em torno de 6,0 g/L quando rotação de 600 rpm foi utilizada, após um tempo de fermentação de 72 horas.

STREDANSKI & CONTI, 1999, relatam a produção de goma xantana em meio sólido, através do processo de fermentação no estado sólido, utilizando bagaço de maçã e grãos de malte impregnados com solução salina de micronutrientes e ainda suplementação com fontes de nitrogênio. Um aparato especial de garrafas rotativas fazia a constante agitação do meio para aeração. A inoculação foi feita com suspensão de células de 48 horas.Ainda durante o cultivo ar estéril era fornecido à cultura, e o tempo de fermentação médio foi de seis dias. Nestes testes a produção de

goma esteve entre 30 e 35 gramas de goma por quilo de substrato sólido, praticamente constante independente do tempo de cultivo e da concentração de açúcar no meio, mostrando que na fermentação no estado sólido, embora não tendo as limitações de aumento de viscosidade, o que ocorre no meio líquido, no meio sólido também existe uma limitação física ao aumento de rendimento de produção de goma xantana.

2.7.3.2 pH

De acordo com LAWRENCE 1976, para o processo fermentativo de produção da goma xantana com a *X. campestris,* a faixa de pH desejável é entre 6,5 e 7,5. O controle do pH pode ser feito com o uso de soluções tampão como o fosfato ácido dipotássico na concentração de 0,4 a 0,5% em peso do meio de fermentação.

Conforme GARCIA-OCHOA, et al., 2000, os autores concordam que pH neutro é o valor ótimo para o crescimento da bactéria *X. campestris.* Durante a produção de goma xantana, o pH decresce do neutro para valores perto de 5,0 devido aos grupos ácidos presentes na molécula da xantana, e alguns autores sugerem que um controle do pH não é necessário para o processo, mas outros autores recomendam o controle ao pH neutro com a adição de álcalis como KOH, NaOH, ou NH_4OH. Estudos mostram que o controle do pH melhora o crescimento celular, mas não tem o mesmo efeito na produção de goma xantana.

KENNEDY & BRADSHAW, 1984, relata que o pH do meio de fermentação decresce devido à formação de ácidos orgânicos e devido às funções ácidas contidas na molécula de xantana, e se o pH baixar de 5,0, a produção de goma xantana diminui drasticamente. Assim é necessário controlar o meio de fermentação no pH ótimo de 7,0, com o uso de soluções tampão, ou pela adição de álcalis durante o processo.

Contradizendo estes dados PAPAGIANNI, et al., 2001, observou um aumento no pH do meio de 7,0 para em torno de 9,0, atingindo 9,5 quando uma rotação de 600 rpm foi utilizada em fermentador de 2,0 litros, utilizando volume útil de 1 litro. Isto foi atribuído às variações e peculiaridades das cepas utilizadas.

Quando o pH não é controlado, a produção de goma xantana cessa quando a fase de estacionária de crescimento é atingida. E quando o pH é controlado, a produção de goma continua durante a fase estacionária de crescimento bacteriano e este efeito é independente do álcali usado para o controle. (GARCIA-OCHOA, et al., 2000).

2.7.3.3 Temperatura

Muitos autores estudaram o crescimento da bactéria *X. campestris* em diferentes temperaturas, na faixa de 22 a 35°C, e 28°C foi definida como sendo a temperatura ótima de crescimento, entretanto a bactéria em questão tem sido cultivada em diferentes temperaturas na faixa de 25 a 30°C. O gráfico da figura 9, mostra a influencia da temperatura no crescimento da bactéria *X. campestris.*

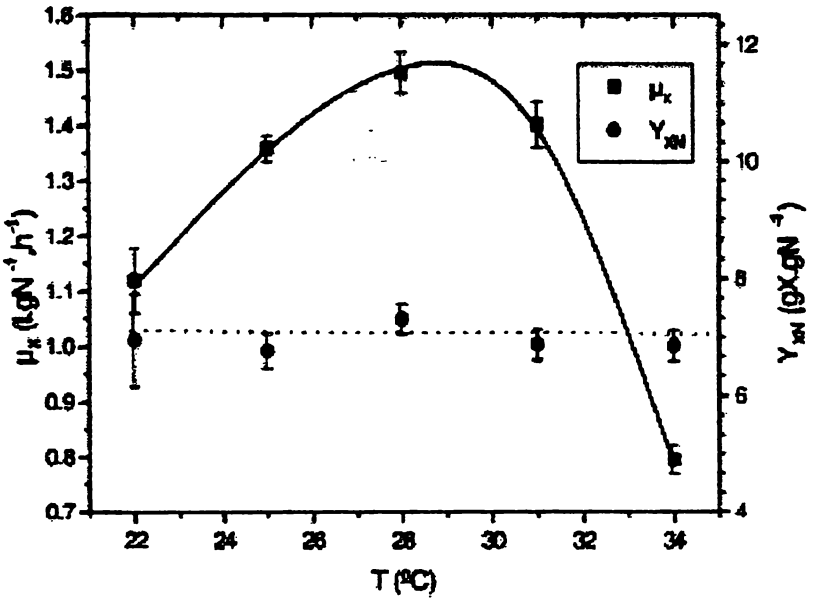


FIGURA 9. Influencia da temperatura na taxa de crescimento específico da bactéria *X. campestris* (μ_x), e no coeficiente de rendimento de biomassa em nitrogênio (Y_{XN}).
FONTE: GARCIA-OCHOA et al., 2000.

De acordo com GARCIA-OCHOA et al., 2000, a temperatura influencia também a produção de goma xantana pela bactéria *X. campestris*. Em testes realizados nas temperaturas de 25, 28, 31 e 34°C, partindo-se da mesma composição de meio, mostraram que temperaturas entre 28 e 31°C, com pH inicial de 7,0, levam a produções semelhantes de goma xantana, em torno de 9,5 g/L de goma xantana; em temperaturas mais baixas de 25°C, bem como na temperatura de 34°C, a produção foi em torno de 7,0 g/L, após 40 horas de fermentação, com agitação de 210 rpm.

Muitos autores estudaram também a influencia da temperatura nas variações de estrutura da goma xantana. Foi estudado principalmente o grau de piruvilação do polissacarídeo produzido, e existe uma concordância que ocorre um grau máximo de piruvilação na temperatura de 27°C (CASAS, 2000).

2.7.3.4 Aeração

Para se obter uma rápida fermentação, é essencial suprir ao meio uma quantidade correta de oxigênio disponível para o crescimento da cultura bacteriana. A faixa de oxigenação recomendável é de 1,5 a 3,5 mmol de oxigênio por litro por minuto (LAWRENCE, 1976).

KENNEDY & BRADSHAW, 1984, também concorda que como a produção de polímeros microbianos como a xantana é sempre feita sob condições aeróbicas, é necessário controlar a aeração e a agitação do meio de fermentação. Como ao longo da fermentação, aumenta a viscosidade do caldo fermentado, aparecem problemas de limitação de transferência de oxigênio, que afetam a quantidade e talvez a qualidade do produto formado. Em pequena escala, com frascos erlenmeyers em agitador orbital, tal limitação provavelmente ocorre, mas em escala maior, a injeção forçada de ar estéril, e agitação vigorosa do meio, são ferramentas úteis para aumentar a taxa de transferência de nutrientes através da membrana celular o que aumenta a eficiência de crescimento e de produção no processo.

PAPAGIANNI, et al., 2001, estudando a produção de goma xantana em

culturas tipo batelada, concluiu que devido ao grande aumento da viscosidade do meio ao longo da fermentação, a produção de goma xantana foi mais eficiente quando no fermentado foram utilizadas rotações de 600 rpm, do que com 100 rpm, confirmando estudos que demonstraram que um bom nível de aeração é requerido para se obter uma boa produção de goma xantana em processos fermentativos.

2.7.3.5 Fonte de Nitrogênio

A fonte de nitrogênio pode ser orgânica, como por exemplo, hidrolisados protéicos de soja, hidrolisados pancreáticos de caseína ou sólidos solúveis de destilarias. Quando são usados somente fontes de nitrogênio orgânicas, a quantidade recomendada fica preferencialmente na faixa de 0,4 a 0,5% em peso do meio de fermentação. Nitrato de amônio pode ser empregado como fonte inorgânica de nitrogênio em quantidades recomendáveis de 0,045 a 0,09 % em peso do meio de fermentação. Farinha ou farelo derivados de cereais ou legumes podem também ser utilizados para o preparo de meio de fermentação ou do preparo do inoculo. As concentrações empregadas recomendadas variam na faixa de 0,02 a 5% em peso do meio de fermentação. A concentração do açúcar varia na faixa de 1 a 5% em peso, sendo que a farinha ou o farelo de cereais ou legumes, dependendo do material, supre também a fonte de carbono do meio. Neste caso a concentração final da fonte de carbono no meio após a adição da farinha ou do farelo de cereais ou vegetais deve variar entre 1 e 5%, sendo que a grau de substituição da fonte de carbono fica entre 2 e 100% dependendo do produto usado. Farinha de arroz é um exemplo de material usado. A farinha de arroz propicia uma melhora na taxa de crescimento da bactéria usada e aumenta significantemente a taxa de produção do colóide hidrofílico de *Xanthomonas.* (LAWRENCE, 1976).

Quando se deseja um produto de alta pureza, destinado à alimentação, as células bacterianas são eliminadas mediante operações adequadas e a xantana é recuperada através de procedimentos tais como: precipitação com álcool, com sais quaternários de amônio e outros. Recentemente foi demonstrado que a ultrafiltração

pode ser uma operação unitária com muitas vantagens no processo. Finalmente o produto recuperado é secado, moído e envasado (ICPDCA, 1999).

STREDANSKI & CONTI, 1999, por fermentação no estado sólido, utilizando suporte inerte, testaram várias fontes de nitrogênio, para o processo de produção de goma xantana. Os melhores resultados obtidos foram com glutamato de sódio, citrato de amônio e uma mistura de peptona e grãos de soja. Para estas fontes de nitrogênio, a produção de goma xantana foi da ordem de 40 a 45 g/L de meio utilizado para impregnar o substrato inerte. Neste caso o meio líquido utilizado continha 75 g/L de sacarose como fonte de carbono e glutamato de sódio como fonte de nitrogênio. A conversão de açúcar a goma xantana foi de 64%. Embora o processo seja mais vantajoso devido à possibilidade de uso de soluções de açúcar mais concentrada quando comparada à fermentação submersa, os processos de recuperação do produto são mais complexos para a fermentação no estado sólido, devido à etapa de extração da goma xantana do substrato sólido, que gera um produto diluído.

2.7.4 Propriedades da Goma Xantana

Apesar da polêmica em torno da natureza da estrutura da goma xantana, é patente que 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 larga faixa de pH;
- Compatibilidade e estabilidade com a maioria dos sais metálicos.

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

A figura 10, mostra as duas formas propostas para a goma xantana. A forma ordenada, onde as ramificações envolvem e assim protegem a cadeia principal, arranjo este responsável pela elevada estabilidade em solução e resistência à degradação, característica deste polissacarídeo (MILAS & RINAUDO, 1991; PETTIT, 1979). O aquecimento de soluções de xantana, normalmente acima de 60°C, ou a dissolução do polissacarídeo em água destilada, propicia a quebra das interações entre as cadeias laterais e o esqueleto polimérico.

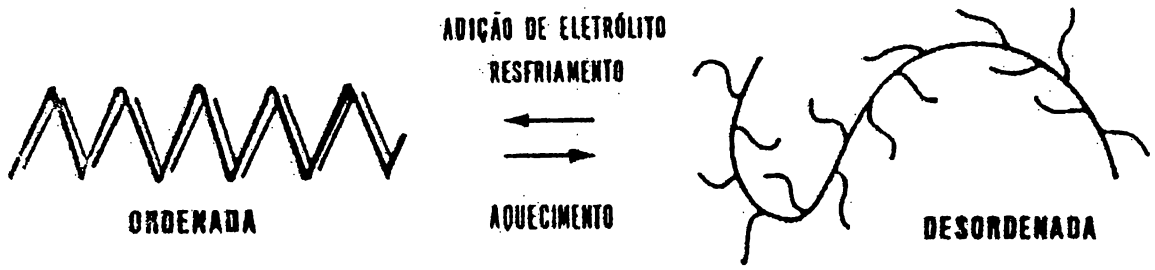


FIGURA 10. Transição conformacional das estruturas ordenada e desordenada da goma xantana.
Fonte: KENNEDY et al., 1984.

A estrutura assim constituída confere à molécula uma flexibilidade característica da conformação desordenada da goma xantana. O aumento do volume hidrodinâmico, decorrente do afastamento das ramificações em relação à cadeia principal, faz com que a viscosidade do polímero em conformação desordenada torne-se maior (LAUNAY et al., 1984; MORRIS, 1985).

Para a goma xantana, pode-se descrever resumidamente as seguintes propriedades:

Viscosidade: a goma xantana se dissolve facilmente, tanto em água quente como fria, sob agitação mecânica, fornecendo soluções de viscosidade elevada a baixas concentrações; Na concentração de 1% produz uma viscosidade de aproximadamente 1000 cps quando a medida é feita a 60 rpm e 25°C, em viscosímetro Brookfield modelo LVF.

Efeito da temperatura na viscosidade: a viscosidade de uma solução aquosa de goma xantana independe da temperatura. Entre 10 e 70°C, soluções com viscosidade de 1000 cps e não apresentarão variações maiores que 100 cps;

Efeito do pH na viscosidade: a viscosidade de uma solução de goma xantana independe do pH entre 6,0 e 9,0. Em pH 9,0 ou acima, a goma xantana é gradualmente desacetilada o que não exerce grande efeito nas propriedades da solução;

Estabilidade ao calor: a goma xantana é muito resistente a degradação pelo calor. Esta resistência é aumentada pela presença de sais como o cloreto de potássio (McNEELY & KENNETH, 1973).

2.8 Propriedades Reológicas das Gomas Xantanas

As mais importantes propriedades das gomas xantanas são a sua alta capacidade de hidratação e a capacidade de formar soluções muito viscosas em sistemas diluídos (LAWRENCE, 1976; KENNEDY & BRADSHAW, 1984; GARCIA-OCHOA, et al., 2000).

A reologia ou "ciência do fluxo", estuda as propriedades que caracterizam o comportamento de sistemas poliméricos quando submetidos à deformação, correlacionando a tensão e a velocidade de deformação (cisalhamento). A constante de proporcionalidade entre estas duas grandezas é denominada de viscosidade, que é caracterizada pela resistência contra o deslizamento entre duas camadas de meio, quando submetidas à uma força tangencial aplicada no seu plano (BRETAS, 1987; GERMANO, 1996).

A viscosidade pode ser definida também como sendo: "a fricção interna ocasionada quando uma camada de fluido se move contra outra camada do mesmo

fluido" (ROVERI, 1996). Assim pode-se tomar medidas desta fricção interna, considerando-a como uma resistência ao fluxo, e denomina-la de viscosidade. A viscosidade de um fluido é função dessa resistência que necessita tanto mais força para deslizar uma camada sobre a outra quanto maior for a resistência ao movimento e que é chamada de cisalhamento. A representação desta definição pode ser expressa pelo modelo de dois planos paralelos de fluido de áreas iguais (A), separados por uma distância (X), e movendo-se em uma mesma direção com velocidades diferentes (dV/dX), conforme representado na figura 11.

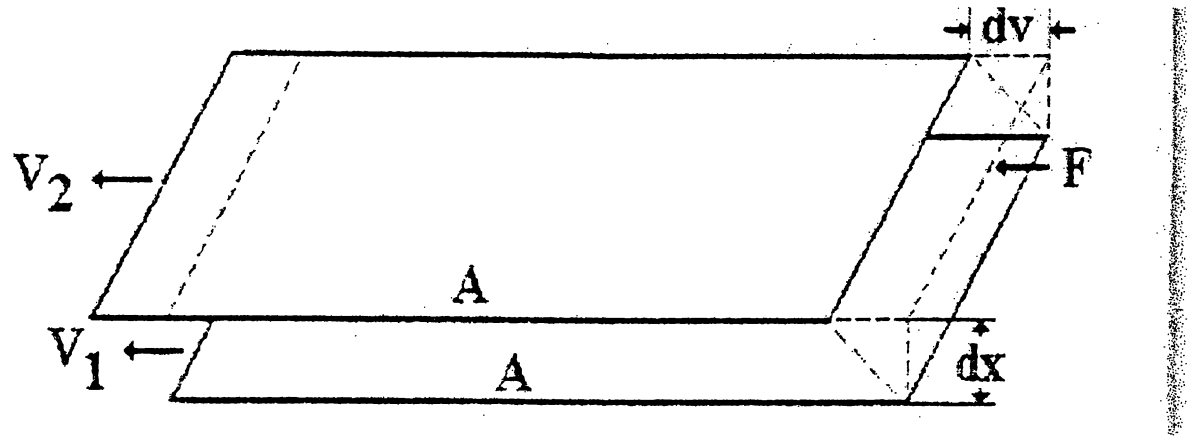


FIGURA 11. Representação gráfica para a definição de viscosidade.
Fonte: ROVERI, 1996.

De acordo com ROVERI, 1996, a área (A) é dada em cm^2, a distância entre os dois planos é dX, e (F) a força necessária para manter a diferença de velocidade entre os planos.

Matematicamente, é válido escrever: F/A = ndV/dX, onde n = constante para um determinado material e denominada de viscosidade.

dV/dX é a medida de velocidade na qual uma camada intermediária se move em relação à outra. Isto descreve o cisalhamento que o líquido experimenta e é chamada de taxa de cisalhamento ou velocidade de cisalhamento.

O comportamento reológico dos corpos fluídos pode ser caracterizado através da relação entre a tensão de cisalhamento, determinada pela relação entre a força aplicada e a área cisalhada, e a velocidade de deslocamento relativo entre camadas

solicitadas por estas forças, taxa de deformação ou ainda taxa de cisalhamento (GRAESSLEY, 1980; GERMANO, 1996).

A unidade fundamental de medida de viscosidade é o Poise. Assim, um dado material que requer uma força de cisalhamento de 1 dina/cm^2, para produzir uma taxa de cisalhamento de 1 seg^{-1}, tem uma viscosidade de 1 Poise, ou 100 centiPoise.

De acordo com BRETAS, 1987, os fluidos podem ser classificados conforme o comportamento da sua viscosidade. Assim, os fluidos que apresentam viscosidade independente da velocidade de cisalhamento são denominados de Fluídos Newtonianos, e aqueles cuja viscosidade é dependente da tensão de cisalhamento são os Fluídos Não Newtonianos.

Os fluídos não newtonianos são classificados em materiais denominados de Binghanianos, Dilatantes e Pseudoplásticos, ainda com base no comportamento de sua viscosidade.

Os materiais que apresentam o comportamento de Bingham, para começarem a fluir necessitam de uma tensão de cisalhamento mínima, e após o início do escoamento mantém uma relação constante entre a tensão e a velocidade de cisalhamento. Para o comportamento dilatante e pseudoplástico, não há necessidade de uma tensão inicial de escoamento, mas tais fluidos apresentam viscosidade que varia de forma não linear com a velocidade de cisalhamento.

Assim um aumento na velocidade de cisalhamento corresponde a um aumento na viscosidade dos materiais com comportamento dilatante, enquanto que a viscosidade dos materiais que apresentam um comportamento pseudoplástico diminui com o aumento da velocidade de cisalhamento (BRETAS, 1987; MILAS & RINAUDO, 1991).

A goma xantana apresenta um comportamento não newtoniano do tipo pseudoplástico, o qual pode ser explicado pela orientação das macromoléculas isoladas na direção do fluxo, pelos diferentes arranjos moleculares e pelo rompimento das interações intermoleculares, devido ao efeito do fluxo.

O comportamento da viscosidade destes fluídos viscosos está representado na figura 12.

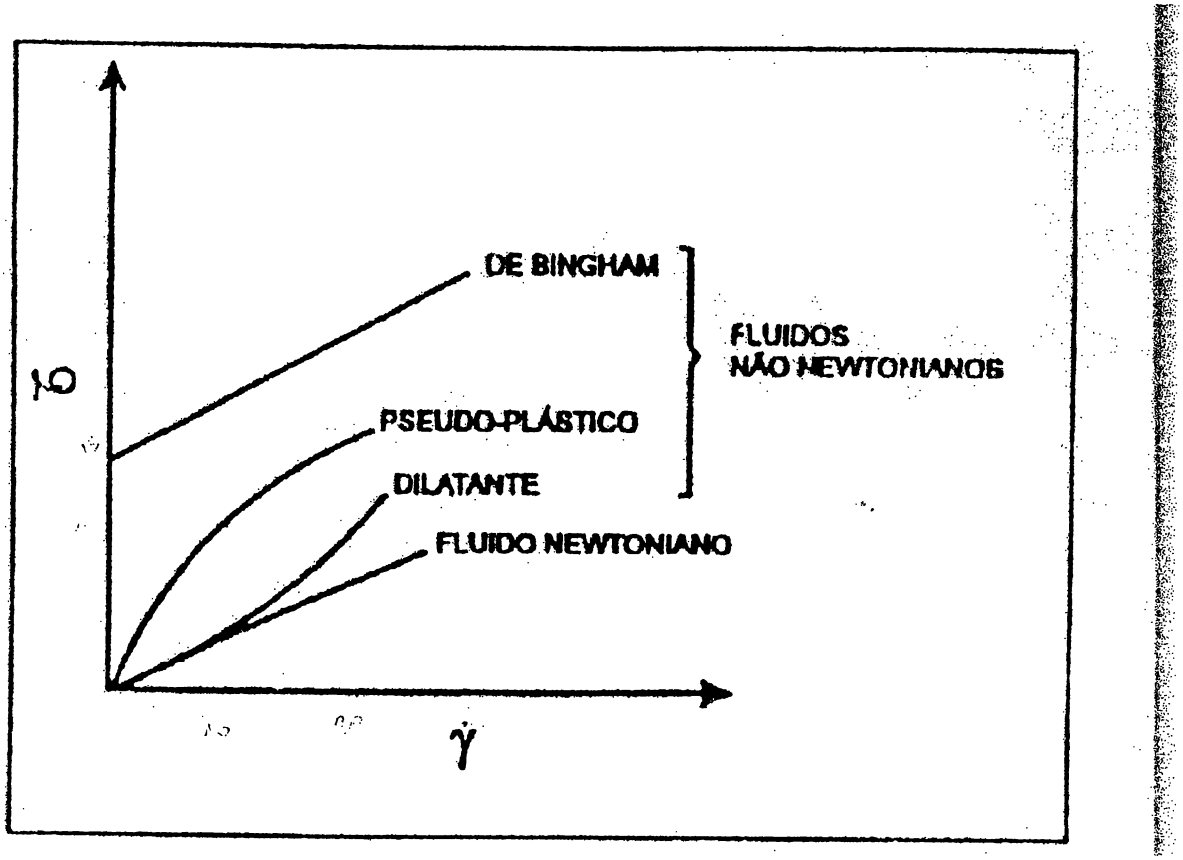
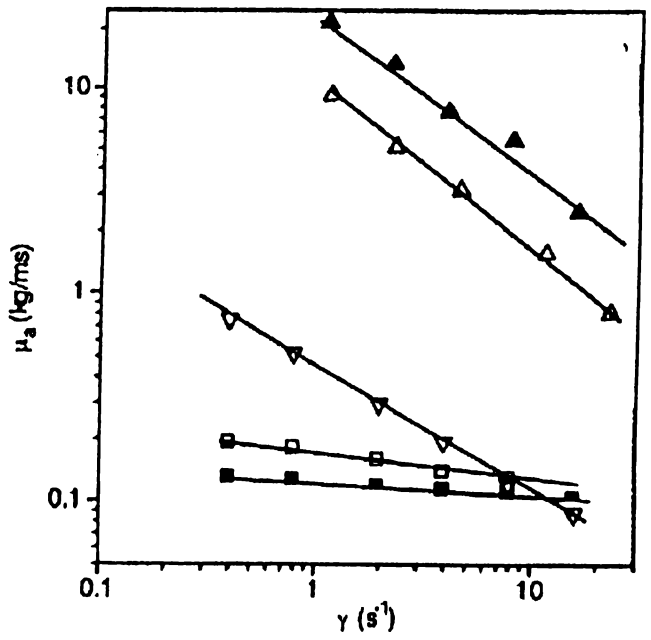


FIGURA 12. Curva de escoamento de fluídos em função da relação Tensão de Cisalhamento (τ) e da velocidade de cisalhamento (γ).
FONTE: MILAS & RINAUDO, 1991.

Alguns polissacarídeos não possuem a propriedade de formar gel isoladamente, mas misturas de polissacarídeos podem produzir géis firmes, como é o caso de galactomananas com a goma xantana. Observa-se que a viscosidade da mistura destes polímeros é aumentada sinergisticamente. A viscosidade destas misturas depende das estruturas das xantanas e das galactomananas. Conforme já observado anteriormente, xantana muda sua conformação dependendo da temperatura da dissolução. Dissolução em temperaturas baixas, a conformação ordenada permite uma melhor interação entre as moléculas de xantana e galactomananas. (GARCIA-OCHOA, et al., 2000).

As viscosidades de vários biopolímeros puros e em mistura estão mostradas na figura 13, onde no eixo das abscissas, está representada a taxa ou a velocidade de

cisalhamento e no eixo das ordenadas a viscosidade de soluções dos biopolímeros puros e em mistura, mostrando que a goma xantana interage com galactomananas.



■ Goma de alfarrobo □ Goma Guar ∇ Goma xantana

▲ Xantana/goma de alfarrobo Δ Goma xantana/goma guar

FIGURA 13. Viscosidade de vários polissacarídeos puros e associados.

Fonte: GARCIA-OCHOA, et al., 2000.

Goma de alfarrobo e goma guar são as galactomananas mais comumente usadas na indústria. Elas são formadas por uma cadeia estrutural de unidades de manoses ligadas a unidades de galactoses. A relação entre galactoses e manoses, bem como a sua distribuição na estrutura, é típica de cada galactomanana. Resíduos de galactose não são uniformemente distribuídos, e as regiões sem galactose (regiões lisas) são as regiões que favorecem as interações com as moléculas de xantana. Ao contrário, de outras regiões com muitos resíduos de galactose (regiões peludas).

Os polissacarídeos como as galactomananas e as xantanas são largamente utilizadas em uma grande variedade de produtos alimentícios ou não, devido aos seus efeitos altamente espessantes, à estabilidade de suas soluções aquosas e a

interação com outros polissacarídeos para formar géis. Soluções espessas, estáveis e macias são obtidas mesmo em baixas concentrações, tornando vantajoso o uso de goma xantana sozinha ou em associação com outros polissacarídeos (GARCIA-OCHOA, et al., 2000; KENNEDY et al., 1984).

2.9. Aplicações da Goma Xantana

Devido às propriedades reológicas da goma xantana, este é um polissacarídeo muito usado como estabilizante em sistemas aquosos. Suas inúmeras áreas de aplicação vão desde o uso em indústrias de alimentos até a utilização em óleos de corte. Na indústria de alimentos, aplicações típicas são em uma grande variedade de emulsões, suspensões e espumas, além de molhos para saladas, molhos prontos, produtos de laticínios, sobremesas, alimentos de baixas calorias, e como espessante de maneira geral. É também usada em produtos de limpeza, tintas, polidores e outros (KATZBAUER, 1988; BECKER, et al., 1998; LIMA, 2001).

Dentre as inúmeras aplicações da xantana em diferentes indústrias, as mais importantes são a petrolífera e a alimentar (ICPDCA, 1999), sendo o primeiro biopolímero de origem microbiana a ser aprovado para uso em indústria petrolífera. Também é usada como aditivo de agentes limpadores e adesivos, serve de base para explosivos e se emprega na cerâmica e na indústria têxtil alimentos (McNEELY & KENNETH, 1973).

2.9.2 Usos em indústria não alimentícias

Na indústria do petróleo a goma xantana é utilizada como ingrediente da lama de perfuração, reparação e acabamento de poços petrolíferos e começou a ser usada na recuperação secundária de hidrocarbonetos. Na indústria de fármacos na elaboração de medicamentos e como ingrediente na textura dos cosméticos. Também está sendo empregada na preparação de tintas, na agroindústria e em outros. Com os avanços tecnológicos, prevê-se que os usos deste produto venha a

aumentar significativamente nos próximos anos, ocorrendo também novas aplicações (ICPDCA, 1999).

A excelente compatibilidade e a natureza pseudoplástica da goma xantana em solução torna-a útil para uso como espessante de tinta pastosa para tecidos, e a baixa viscosidade em altas taxas de cisalhamento, permite o controle da migração da cor nos fios de tecidos (McNEELY & KENNETH, 1973)

A excelente compatibilidade da goma xantana com outros sais e a sua resistência à degradação pela temperatura, torna viável o seu uso como aditivo para óleos de corte, para reduzir as perdas por fricção no processo de corte de materiais duros. A goma xantana é um ótimo agente de suspensão para glasuras cerâmicas e outras misturas difíceis de se manter em suspensão. A sua 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. Da mesma forma, estas propriedades fazem da goma xantana o produto apropriado para uso em produtos de limpeza e polidores. Favorece a suspensão de abrasivos e torna o produto fácil de verter e de espalhar. Devido ao seu poder umectante, de fácil dispersão e elevada pseudoplasticidade, a goma xantana é usada também em tintas (McNEELY & KENNETH, 1973; BECKER, et al., 1998; KENNEDY et al., 1984).

2.9.2 Usos na indústria alimentícia

Mas a mais importante utilização da goma xantana, sozinha ou associada a outra gomas é na indústria alimentícia. A goma xantana é produto aprovado para ser utilizada na composição de alimentos, pelo FDA, órgão norte americano que estuda, analisa, regulamenta e aprova todos os produtos para serem utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica (ATKINSON & MAVITUNA, 1987).

Nas indústrias 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, a goma xantana é um 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 á sua alta estabilidade térmica, a goma xantana é um o produto indicado, e é largamente utilizado para estabilizar emulsões de alimentos enlatados de atum, frango, presunto e batata formulados com molhos. A adição de goma xantana a recheio de tortas e pudins congelados á base de amido podem melhorar as propriedades estabilizantes evitando a sinerese e retrogradação depois de um ou dois ciclos. O preparo de aperitivos como picles, tomate, cebola e mostarda, é severamente limitado devido às condições agressivas e limitantes do meio de preparo. Estes meios contém altas concentrações de sais, alta acidez, baixo pH ou a combinação de dois fatores. A goma xantana não só é compatível com estes meios, como também é o produto mais indicado como agente estabilizante, emulsificante e espessante nestas condições adversas, sendo efetiva em aperitivos em concentrações de ~0,1%. A propriedade de pseudoplasticidade de suas soluções facilita o bombeamento, o envase e a retirada do produto da embalagem para uso, mas devido á alta viscosidade aparente dentro das embalagens garante a estabilidade dos produtos. 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. Aplicações importante são também nas indústria de laticínios, na fabricação de queijos cremosos (McNEELY & KANG, 1973; LAWRENCE, 1976; KENNEDY & BRADSHAW, 1984; ATKINSON & MAVITUNA, 1987; BECKER et al., 1998; YALPANI & SANDFORD, 1988; GARCIA-OCHOA, et al., 2000).

2.9.3 Usos na indústria farmacêutica

De acordo com McNEELY & KANG 1973, e KENNEDY & BRADSHAW, 1984, na indústria farmacêutica, estudos tem mostrado que a goma xantana tem excelentes propriedades como agente de encorpamento para pasta de dente, para manter a sua forma, mas este é um uso ainda não homologado pelo FDA, e a goma xantana é um ingrediente permitido para todos os usos, exceto para usos médicos, ou

seja não é permitido como componente de medicamentos.

2.10 Processos de Recuperação de Goma Xantana

Ao final de qualquer fermentação, via de regra, tem-se um caldo fermentado, uma mistura complexa, composta basicamente por células do microrganismo utilizado no processo, produtos extracelulares solúveis, componentes celulares, restos de substrato e nutrientes não utilizados pelo microrganismo e os metabólitos ou o metabólito principal produzidos no processo. Este metabólito deve ser removido da solução e purificado para comercialização (BAILEY & OLLIS, 1986).

As etapas de pós-fermentação são importante para garantir o máximo rendimento de recuperação do produto.

De acordo com BAILEY, & OLLIS, 1986; e ATKINSON & MAVITUNA, 1987, operações de remoção de matéria insolúvel, isolamento de componentes primários, processos de purificação e isolamento final do produto, são as etapas seqüenciais que devem ser cumpridas para se obter o produto puro a partir de um caldo fermentado.

Particularmente para a goma xantana o processo de extração do polímero produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*, é difícil e caro. O processo de purificação deve ocorrer sem desestruturar o polímero. O caldo fermentado contém de 10 a 30 g/L de goma xantana produzida, de 1 a 10 g/L de células e de 3 a 10 g/l de nutrientes residual, além de outros metabólitos em menor quantidade. Em função do alto teor de goma produzida, o caldo fermentado é muito viscoso e de difícil manuseio, principalmente para a remoção de biomassa bacteriana produzida. Para o processamento, e uma diluição é normalmente feita para facilitar este processo (GARCIA-OCHOA, et al., 1993; KENNEDY & BRADSHAW, 1984).

O método de purificação da goma depende do seu uso; se para a indústria alimentícia, um alto grau de pureza é exigido, não se admite células de microrganismo no produto. Para o uso em processos de recuperação de óleo, células presentes podem obstruir filtros, mas produtos com aplicações menos restritivas, podem ser produzidos para a indústria têxtil (GARCIA-OCHOA, et al., 1993).

De acordo com GARCIA-OCHOA, et al., 2000, as etapas de recuperação e purificação da goma xantana inclui, destruição ou remoção das células bacterianas, precipitação do polímero, deságüe, secagem e moagem, conforme mostrado na figura 8, produzindo ao final um pó seco ou uma solução concentrada.

Muitas alternativas podem ser usadas para a remoção das células, por exemplo, o tratamento com químicos como álcalis, hipoclorito, mas o pH alto pode causar despirivilação da cadeia, ou enzimas que causam a lise das células, mas estas devem ser inativadas posteriormente. Remoção mecânica e tratamento térmico por pasteurização ou esterilização do caldo fermentado também são tratamentos indicados. Este tratamento térmico pode também auxiliar a remoção de goma das células, mas o tratamento térmico deve ser moderado para não degradar o polímero produzido. Condições ideais de pasteurização que possibilita boa dissolução da goma, ruptura das células bacterianas e não degradam o polissacarídeo estão na faixa de 80-130°C por 10-20 minutos, após remoção das células pode ser feita por filtração ou centrifugação (SMITH & PACE, 1982; BAILEY & OLLIS, 1986).

Para soluções muito viscosas, uma diminuição da viscosidade por diluição do meio ou qualquer outro meio, devem ser feitos antes da remoção mecânica para facilitar o processo mecânico(GARCIA-OCHOA, et al., 2000).

A precipitação do polímero, que é um colóide hidrofílico, portanto solúvel em água, é conseguida diminuindo-se a solubilidade do colóide através de métodos como adição de sais trivalentes ou tetravalentes, adição de solventes solúveis em água, adição de solventes orgânicos como o etanol e o isopropanol, ainda o uso de sais e solventes orgânicos. O mais comum para o isolamento e purificação do polímero é o uso de solventes orgânicos como o etanol. O custo do produto aumenta consideravelmente com o custo do álcool para a precipitação (SMITH & PACE, 1982; GARCIA-OCHOA, et al., 1993; KENNEDY & BRADSHAW, 1984; GONZALES et al., 1989; GALINDO. & ALBITER, 1996). É importante o estudo dos mecanismos da precipitação para testar alternativas e determinar as condições ótimas da precipitação com os álcoois.

O uso de álcoois como o etanol, metanol, isopropanol, ou acetona, que são não solventes para o polissacarídeo, podem ser adicionados ao caldo de fermentação

para diminuir a sua solubilidade. GARCIA-OCHOA, et al., 2000, relata que a quantidade do álcool a ser usado depende da natureza do solvente (FIGURA. 14). Para o isopropanol, ou para a acetona, a precipitação total da goma ocorre com três volumes de álcool para um volume do caldo. Para o etanol são necessários seis volumes de solvente por volume de caldo fermentado.

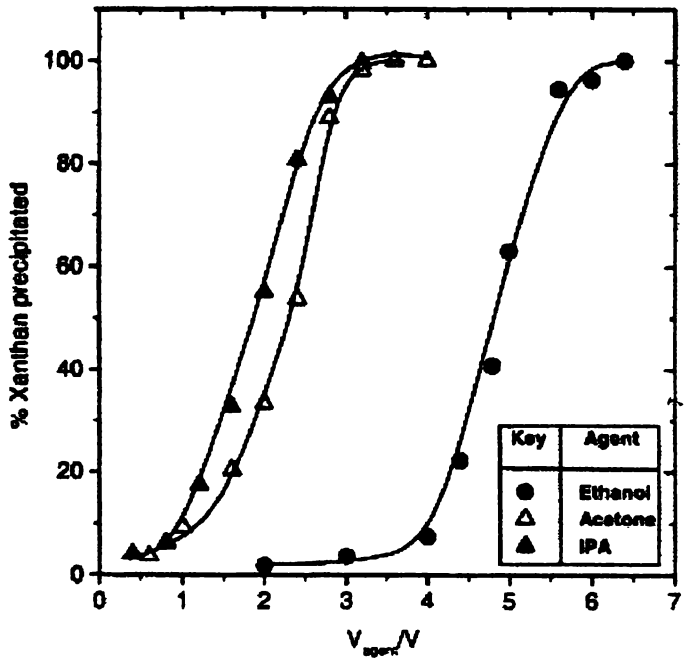
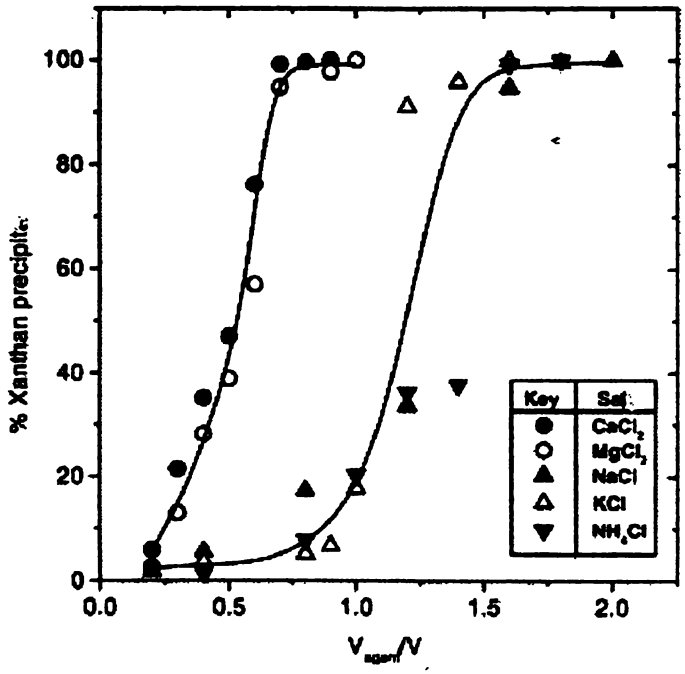


FIGURA 14. Precipitação da goma xantana nsando solventes orgânicos.
IPA = Isopropanol.
FONTE: GARCIA-OCHOA, et al., 2000.

A adição de sais de cátions polivalentes como cálcio e alumínio e sais de amônio quaternário em concentração suficiente causa a precipitação do polímero devido á formação de pontes de cátions do sal adicionado com os grupos ionizados do poliânion, a precipitação não ocorre com sais monovalentes (PACE & RIGHELATO, 1981).

O uso de misturas de álcool e sais, melhora a precipitação do polímero, pois não só diminui a solubilidade da goma no meio aquoso como também favorece o processo com a formação de pontes de cátions que estão presentes, o que possibilita uma precipitação da goma xantana com a adição de menos álcool. O processo no

qual goma xantana é precipitada com isopropanol, o volume de álcool necessário é reduzido quando sais monovalentes são usados, mas a redução é maior com o uso de sais divalentes (FIGURA. 15). Quando 1 g/L de cloreto de sódio ou de potássio é adicionado á solução, o volume de isopropanol necessário para a precipitação quase que completa da goma xantana é reduzido à metade (GARCIA-OCHOA, et al., 1993; BAILEY, & OLLIS, 1986).



• $CaCl_2$ o $MgCl_2$ ▲ NaCl Δ KCl ▼ NH_4Cl

FIGURA 15. Precipitação de goma xantana usando misturas de isopropanol com 1 g/L de sais mono e divalentes.
FONTE: GARCIA-OCHOA, et al., 2000.

2.11 Secagem

Depois de obtido como precipitado úmido, a goma xantana deve ser seca, moída e empacotada. A secagem pode ser feita em batelada ou em secadores contínuos á vácuo ou com circulação forçada de um gás inerte ou ainda em spray-drier. A umidade final de gomas xantana comerciais é da ordem de 10%. Depois de

seco, os flocos do material podem ser moídos para o controle do tamanho das partículas, da dispersibilidade no preparo de soluções e das taxas de dissolução do produto. Para comercialização o pacote deve ser à prova d'água, pois o produto é higroscópico (SMITH & PACE, 1982; GARCIA-OCHOA, et al., 2000; BAILEY & OLLIS 1986).

2.11.1 Secadores-pulverizadores

Nos secadores pulverizadores ou spray dryer, um líquido ou xarope com uma certa concentração de sólidos dissolvidos é dispersa ou aspergida na forma de neblina de finas gotas em um fluxo de gás quente. A transferência de calor e a de massa são realizadas pelo contato direto entre o gás quente e as gotículas dispersas. Nestas condições a umidade é rapidamente vaporizada das gotículas, produzindo partículas secas do sólido presente na solução inicial, que são então separadas do fluxo de gás e vapor por gravidade na câmara de vaporização. Para prevenir que gotas do líquido ou partículas úmidas caiam junto com os sólidos secos, a câmara de vaporização, geralmente cilíndricas, são sempre grandes. Diâmetros de 2,5 a 9,0 m são comuns em instalações industriais, dependendo do fluxo de líquido (McCABE, et al., 1993).

Após o ar úmido com os sólidos secos, na forma de finas partículas, passam através de um ciclone separador onde qualquer partícula do sólido é removida. Os sólidos secos decantam no fundo de ciclones, geralmente externos à câmara de secagem, de onde são removidos através de válvula rotatória ou rosca tipo parafuso sem-fim (McCABE, et al., 1993; PERRY & CHILTON, 1973).

A secagem e a pulverização envolvem três processos unitários fundamentais: (1) atomização do líquido; (2) mistura do gás quente com as gotículas atomizadas; (3) secagem das gotículas líquidas.

A atomização é realizada usualmente por um dos três dispositivos: (1) bocais de alta pressão; (2) bocais de dois fluídos; (3) discos centrifugadores de alta velocidade. Com estes atomizadores é possível dispersar soluções diluídas em gotículas que chegam a 2 micras. Em virtude da grande superfície total de secagem e

da pequena dimensão das gotículas criadas, o tempo real de secagem num secador pulverizador é medido em segundos (PERRY & CHILTON, 1980)

A dispersão ou aspersão de um líquido ou xarope com uma certa concentração de sólidos dissolvidos na forma de neblina de finas gotas em um fluxo de gás quente para secagem pode conseguida passando o líquido pressurizado através de um bico fino com uma agulheta interna concêntrica ao bico, desta forma um fluxo do líquido de formato cônico entra no cilindro de vaporização junto com o gás quente.

De acordo com McCABE, et al., 1993, considerado apenas como secadores os secadores pulverizadores não são muito eficientes, porque muito calor é perdido com os vapores, são instalações muito grandes, muita energia é necessária para evaporar instantaneamente o líquido e a sua operação não é sempre fácil. A densidade, ou o volume da partícula de sólido produzido, propriedade de extrema importância no processo, é difícil de ser mantida constante, por isso o processo é extremamente sensível a alterações no teor de sólidos do líquido de entrada, à temperatura do gás de vaporização e outros fatores. As partículas finais do sólido seco são geralmente porosas e o produto final leve.

Uma das principais vantagens da secagem por pulverização está na produção de partículas esféricas, ocas ou maciças, que não se obtém usualmente em nenhum outro processo de secagem. Geralmente soluções aquosas de sabão, gelatina ou polímeros solúveis em água, formam películas externas finas e resistentes e partículas esféricas ocas no processo de secagem por pulverização (PERRY & CHILTON, 1980).

Um esquema genérico de funcionamento de secadores pulverizadores está mostrado na figura 16.

As variáveis do projeto devem ser estabelecidas mediante ensaios experimentais antes de se efetuar o dimensionamento final da câmara de secagem. Em geral, a dimensão da câmara, a escolha do atomizador e os auxiliares de separação serão determinados pelas características físicas do produto.

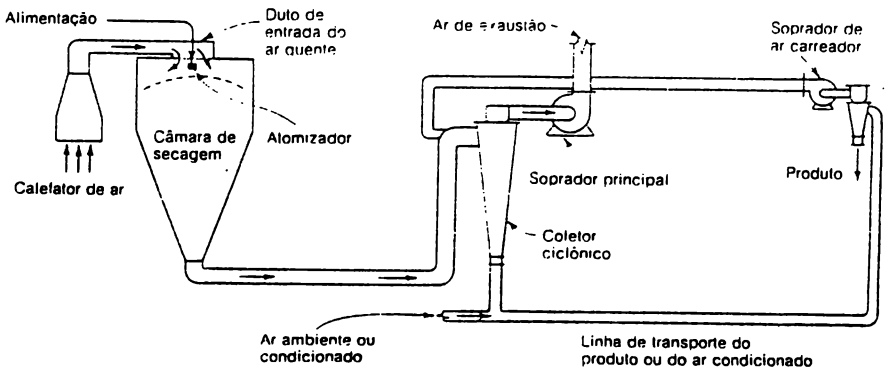


FIGURA 16: Instalação e funcionamento de secador-pulverizador típico, incluindo um resfriador pneumático do produto
FONTE: PERRY & CHILTON, 1980.

De acordo com PERRY & CHILTON, 1980, devem ser fixadas antes do projeto industrial de um secador pulverizador as seguintes variáveis: (1) a forma e a dimensão da partícula do produto desejado; (2) as propriedades físicas da mistura: umidade, viscosidade, densidade, etc; (3) as temperaturas máximas do gás afluente e do produto. Equações teóricas desenvolvidas para o desempenho de secadores pulverizadores, podem ser usadas para ampliação de escala dos secadores de laboratório. Algumas hipóteses devem ser fixadas, entre elas: (1) para avaliar o coeficiente de transmissão de calor usa-se o número de Nusselt da gotícula = 2 e número de Reinolds = 0, o que corresponde á condução pura no infinito; (2) admite-se condição de secagem uniforme em toda a câmara, devido á turbulência existente no interior da câmara; (3) A força motriz da secagem é a diferença entre a temperatura de saída do gás quente e a temperatura de saturação adiabática da solução saturada pura.

Conforme PERRY & CHILTON, 1980, no caso de bocais pneumáticos, o cálculo do diâmetro médio da gota e o calor necessário para o pulverizador podem

ser calculados pelas relações desenvolvidas por Nukiyama e Tanasawa, para o cálculo do diâmetro médio da gota, X_v e por Gluckert para o cálculo da transferência de calor, Q:

$$X_v = 1920(\alpha)^{1/2} / V_a(\rho_L)^{1/2} + 597[\mu/(\alpha\rho_L)^{1/2}]^{0,45} (1000\ Q_L/Q_a)^{1,5}$$

Onde:

X_v = diâmetro médio da gota, em micra

α = tensão superficial, em dyn/cm

μ = viscosidade do líquido, em Poise

V_a = velocidade relativa entre o ar e o líquido, em ft/s

ρ_L = densidade do líquido, em g/cm^3

Q_L = vazão do líquido

Q_a = vazão do ar

$$Q = 6,38\ K_f\, v^{2/3}\, \Delta t\, \omega_s / D_m^2\, \rho\, [\rho_a\, (\omega_a + \omega_s) / \omega_a V_a/\omega_a\ ]^{1/2}$$

Onde:

K_f = condutividade térmica da película gasosa que envolve a gotícula, estimada na temperatura média entre a do gás e a da gota, em Btu/h ft^2

v = volume da câmara de secagem, em ft^3

Δt = força motriz nas condições de contorno descritas acima, em °F

D_m = diâmetro máximo da gota, em ft

ω_s = vazão mássica do líquido, em lb/h

ρ_s = densidade do líquido, lb/ft^3

ω_a = vazão do ar de atomização, em lb/h

ρ_a = densidade do ar de atomização, em lb/ft^3

V_a = velocidade do ar de atomização, em ft/h

O volume da câmara de secagem pode ser determinado pelo gráfico mostrado na figura 17.

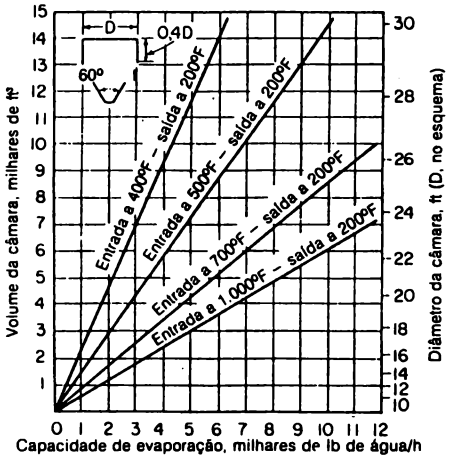


FIGURA 17: Relação entre o volume da câmara de vaporização e a capacidade de evaporação de secadores pulverizadores, com dados baseados em um tempo de retenção total do sólido de 20 s.
FONTE: PERRY & CHILTON, 1980.

2.11.2 Filtros Rotatórios a vácuo

Os filtros rotatórios a vácuo são equipamentos indicados para desidratação e secagem de sólidos suspensos em líquidos, principalmente voláteis, pois promovem a separação e favorecem a secagem dos mesmos. Como a goma xantana é um sólido solúvel em água precipitado por solventes orgânicos como etanol, isopropanol, e outros, o uso de filtros rotatórios á vácuo é indicado para a secagem do sólido precipitado (ATKINSON & MAVITUMA, 1991; GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Os filtros rotatórios a vácuo são equipamentos de operação contínua, composto por um tambor rotativo, formado por vária câmaras ou sessões radiais.O vácuo é aplicado internamente ao cilindro, e a torta é formada externamente, sendo formada e descarregada a cada volta do tambor. Como mostrado na figura 18, a filtração tem três etapas principais: (a) filtração e formação da torta, (b) deságüe ou remoção parcial do solvente, (c) descarga da torta. A rotação do cilindro, o vácuo aplicado e a capacidade de filtração do equipamento por hora são definidos pela quantidade de sólidos suspensos presentes no meio líquido e pelo grau de secagem

desejado para a torta sólida. O sistema pode ser estudado teoricamente ou experimentalmente para a definição das condições operacionais para cada tipo de sólido (ATKINSON & MAVITUNA, 1991).

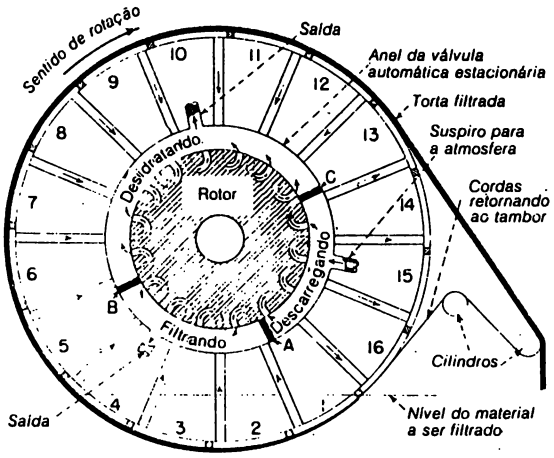


FIGURA 18. Diagrama de operação contínua dos filtros rotativos à vácuo. As sessões de 1 a 4 são de filtração, sessões de 5 a 12 são de deságüe, sessão 13 é de descarga da torta e sessões de 14 a 16 estão prontas para um novo ciclo.
(FONTE: PEERY & CHILTON, 1973)

De acordo com BELTER et al., 1988, considerando-se que a resistência do meio filtrante pode ser desprezada, que a torta formada com os sólidos é compressível, e que para t=0, V=0, o fluxo de filtração pode ser expresso em função do tempo do ciclo pela formula:

$$V/A\ t_c = [\ 2\beta(\Delta P)^{1-S}/\mu\alpha\rho\ t_c\ ]^{1/2}$$

Onde:

V = volume de filtrado coletado,

A = área da superfície de filtragem,

t_c = tempo de um ciclo

β = fração de tempo do ciclo gasta na formação da torta

ΔP = diferença total de pressão entre o meio filtrante e a torta depositada

μ = viscosidade do filtrado

α = resistência específica da torta

ρ = densidade do filtrado

No caso da goma xantana, os sólidos removidos do filtro a vácuo devem ser secados para a remoção de todo o solvente presente na torta, e depois de moídos para equalizar a granulometria do produto e empacotado (ATKINSON & MAVITUNA, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

O estudo de produção de goma xantana com substratos alternativos foi feito, empregando-se a cepa de *Xanthomonas campestris,* disponível no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná. Esta cepa foi cedida pelo Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Indústria Química – INTEC, de Santa Fé, Argentina.

3.2 Conservação da Cepa

A cepa de *Xanthomonas campestris* utilizada neste estudo foi conservada em tubos inclinados com meio de crescimento especificado na tabela 4, que apresenta também o meio básico sugerido de produção de goma xantana.

Para o preparo do meio sólido, os componentes do meio de crescimento, incluindo o agar, foram diluídos em água destilada, o pH foi ajustado com solução de NaOH 1 N, e distribuído em tubos à razão 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 a cepa da bactéria *Xanthomonas campestris,* os tubos foram incubados por 48 horas em estufa a 28-30°C e após, com a cepa desenvolvida, foram conservados em geladeira.

TABELA 4. Meios básicos de crescimento 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_2PO_4 (g/L)	0,1	0,1
$CaCO_3$ (g/L)	10	-
Agar (%) – meio sólido	17	-

3.3 Preparo do Inoculo

Para o preparo do inoculo, a cepa crescida em meio sólido, foi inoculada em tubos de ensaio contendo o meio líquido de crescimento.

Para o preparo do meio líquido, os componentes do meio de crescimento, excluindo-se o agar, foram diluídos em água destilada, o pH foi ajustado com solução de NaOH 1 N, e distribuído em tubos à razão de 10 mL por tubo, e em erlenmeyers de 125 mL, à razão de 25 mL por erlenmeyer, fechados com algodão e autoclavados a 121°C, durante 15 minutos. Após a esterilização os tubos contendo o meio de crescimento foram inoculados com a cepa da bactéria *Xanthomonas campestris.* Os tubos foram incubados por 48 horas em estufa a 28-30°C e após, este meio contendo as células bacterianas multiplicadas, foram novamente inoculadas em erlenmeyers com o meio líquido de crescimento, à razão de 2 mL do pré-inóculo por erlenmeyer com 25 mL de meio, e incubados em agitador orbital na rotação de 160 rpm, por 36 horas. O inoculo assim preparado, incubado por 36 horas, foi utilizado como suspensão semente para os testes do estudo.

3.4 Substrato

A casca de café e o bagaço de mandioca usados na preparo dos substratos usados no testes fermentativos estão mostrados na figura 19.

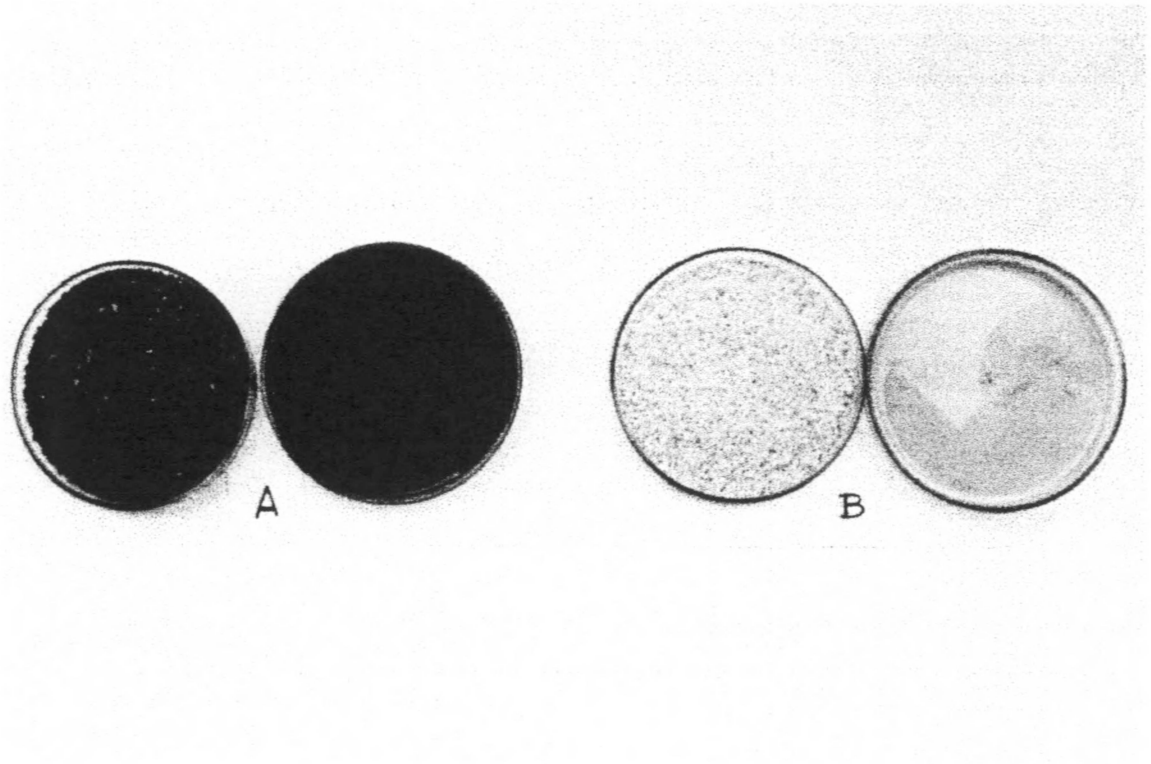


FIGURA 19. Hidrolisados e os resíduos industriais utilizados: (A) casca e hidrolisado de casca de café. (B) bagaço e hidrolisado de bagaço de mandioca.

3.4.1 Preparo das Casca de Café

A casca de café recebida em sacas no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, foi fornecida pela Indústria de Café Damasco, foi seca no laboratório em estufas e estocada em embalagens de plástico. Para utilização, as cascas secas foram moídas em moinho manual e posteriormente o material moído foi classificado em peneiras de acordo com a sua granulometria:

Fração grossa: maior que 2,0 mm (reprocessada).

Fração média: entre 0,8 e 2,0 mm (usada no preparo do hidrolisado).

Fração fina: menor que 0,8 mm (descartada).

A figura 20 mostra as cascas de café antes e depois do processamento feito para equalizar a granulometria do material.

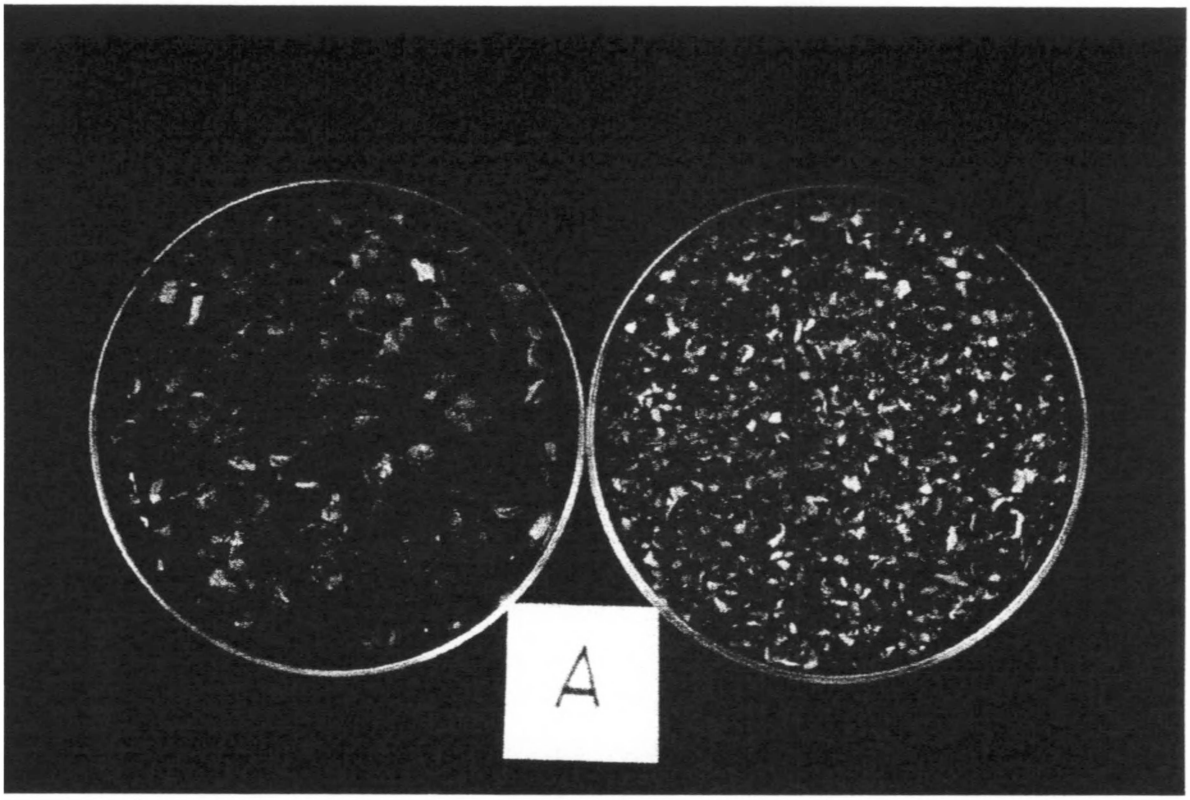


FIGURA 20. Cascas de café antes e depois do processamento para equalização da granulometria do material.

3.4.2 Determinação da composição centesimal das cascas de café

Com o objetivo de determinar a composição centesimal das cascas de café, a fração média de material obtido na classificação, foi analisada. Foram realizadas análises de umidade, teor de cinzas, proteínas, lipídeos, fibras e açúcares redutores.

3.4.2.1 Umidade

A umidade foi determinada por gravimetria, após secagem em estufa a 105°C até peso constante.

3.4.2.2 Cinzas

As cinzas foram determinadas por gravimetria após a calcinação do material a 660°C por 24 horas.

3.4.2.3 Proteínas

A fração protéica foi determinada indiretamente, através da determinação da concentração de nitrogênio pelo método Kjedhal (ADOLFO LUTZ, 1985).

3.4.2.4 Lipídeos

A concentração de lipídeos foi determinado por gravimetria após extração com acetato de etila, refluxado por duas horas em extrator soxlet.

3.4.2.5 Açúcares Totais

O teor de açúcares totais da casca de café foi determinado pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), após hidrólise ácida, conforme descrito a seguir:

2 gramas de casca de café na granulometria de0,8 a 2,0 mm, foram colocados em balão de fundo chato de 100 mL com 50 mL de água e 2 mL de HCl, levados ao banho maria por 20 minutos. Após resfriado, o material foi neutralizado com NaOH 40%, transferido para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume. Após filtrado, foi determinado no sobrenadante a concentração de açucare redutores, pelo método Somogyi-Nelson.

3.4.3 Preparo do Hidrolisado de Casca de Café

A auto-hidrólises térmicas das cascas de café, assim chamada porque não foi usado no processo nenhum composto ácido ou alcalino, e mesmo assim o pH da solução apresentava-se baixo devido a compostos de caráter ácido inerentes da casca seca, foi feita em erlenmeyers de 250 mL e uma concentração de cascas de café de 100 g de casca/L de fase líquida. A fase líquida consistia de água deionizada. O tratamento com vapor foi feito em autoclave.

A otimização das condições de hidrólise foi feita utilizando planejamento experimental fatorial 3^2. Foram testados dois fatores experimentais (temperatura e

tempo de tratamento), distribuídos em três níveis. A análise dos dados foi feita por superfície de resposta através do programa "statistica". Os valores reais e codificados das variáveis experimentais estão apresentados na tabela 5. Cada tratamento experimental foi realizado em duplicata.

As fases líquidas foram separadas das fases sólidas por filtração e então determinado o teor de açúcar redutor solúvel, recuperado da casca de café.

TABELA 5. Variáveis experimentais usadas no planejamento fatorial para a determinação das condições ótimas de auto-hidrólise da casca de café.

Valores Codificados	-1	0	+1	
Fatores				Unidade
Temperatura	100	120	140	°C
Tempo	5	10	15	Minutos

O hidrolisado de cascas de café, mostrado na figura 21, constitui o substrato utilizado nos testes do processo fermentativo, obtido realizando-se o tratamento térmico das cascas de café classificadas, também mostradas na figura 21.

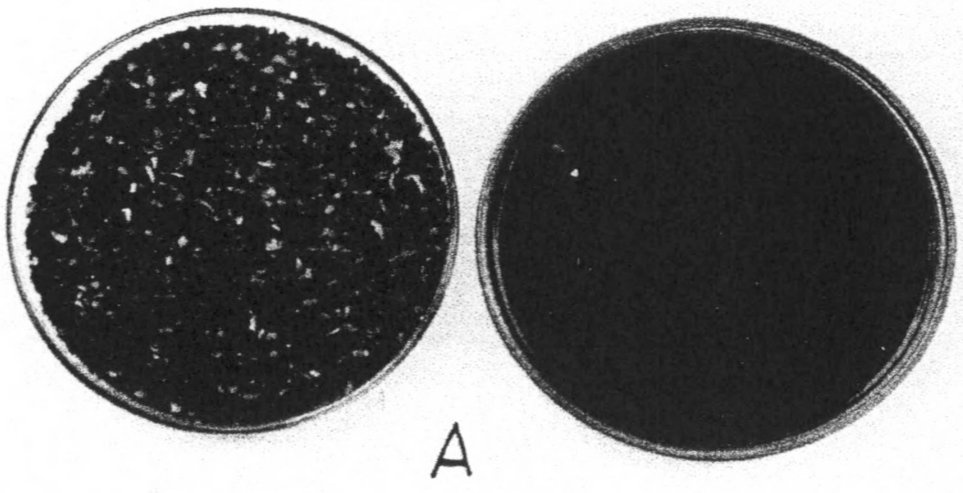


FIGURA 21. Cascas e hidrolisado de cascas de café.

Condições de tempo e temperaturas ótimas foram usadas para se obter o maior rendimento possível em açúcar redutor recuperado das cascas.

Após a determinação da concentração de açúcar redutor solúvel no hidrolisado, este foi convenientemente diluído para se obter a concentração de açúcar redutor desejada para o processo fermentativo e tinha o pH ajustado para 7,0 – 7,2 com solução de NaOH 1N.

O hidrolisado foi a seguir complementado com extrato de levedura e KH_2PO_4 conforme indicado na tabela 4.

3.4.4 Preparo do Bagaço de Mandioca

O bagaço de mandioca recebido em sacas no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, foi fornecida pela Cia Lorenz localizada em Três Pontas – Paraná, foi seca em estufas e estocada em embalagens de plástico. Para utilização, as cascas secas foram moídas em moinho manual e posteriormente o material moído foi classificado em peneiras de acordo com a sua granulometria:

Fração grossa: maior que 2,0 mm (reprocessada).

Fração média: entre 0,8 e 2,0 mm (usada no preparo do hidrolisado).

Fração fina: menor que 0,8 mm (descartada).

A figura 22 mostra o bagaço de mandioca antes e depois da moagem e peneiramento, processamento feito para equalizar a granulometria do material.

3.4.5. Determinação da Composição Centesimal do Bagaço de Mandioca

Com o objetivo de determinar a composição centesimal do bagaço de mandioca, a fração média de material obtido na classificação, foi analisada. Foram realizadas análises de umidade, teor de cinzas, proteínas, lipídeos, fibras e amido.

3.4.5.1 Umidade

Conforme item 3.4.2.1

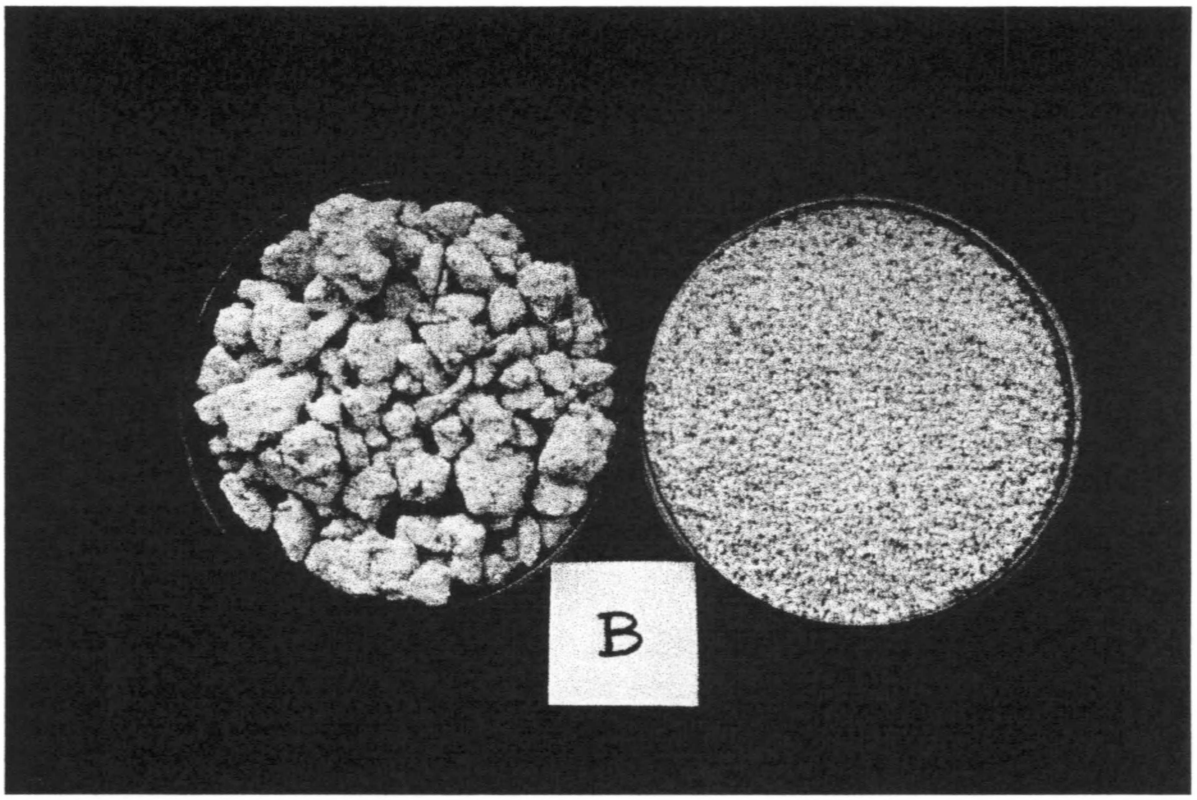


FIGURA 22. Bagaço de mandioca antes e depois do processamento para equalização da granulometria do material.

3.4.5.2 Cinzas

Conforme item 3.4.2.2

3.4.5.3 Proteínas

Conforme item 3.4.2.3

3.4.5.4 Lipídeos

Conforme item 3.4.2.4

3.4.5.5 Amido

O teor de amido do bagaço de mandioca foi determinado pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), que mede açúcares redutores, após hidrólise ácida, conforme descrito a seguir:

2 gramas de bagaço de mandioca na granulometria de 0,8 a 2,0 mm, foram colocados em balão de fundo chato de 100 mL com 50 mL de água e 2 mL de HCl, levados ao banho maria por 20 minutos. Após resfriado, o material foi neutralizado com NaOH 40%, transferido para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume. Após filtrado, foi determinado no sobrenadante a concentração de açucares redutores, pelo método Somogyi-Nelson.

3.4.6 Preparo do Hidrolisado de Bagaço de Mandioca

O amido presente no bagaço de mandioca pode ser convertido em açúcar redutor, glicose através da hidrólise deste material. A hidrólise pode ser feita submetendo-se o bagaço de mandioca a um tratamento térmico por tempos definidos em meio aquoso, com um agente ácido ou alcalino, ou então utilizando-se enzimas específicas, amilase e amiloglucosidase, para a quebra das ligações glicosídicas que formam o amido. Em ambos os casos, o resultado final é um xarope de glicose.

3.4.6.1 Hidrólise ácida de bagaço de mandioca

As hidrólises ácido-térmicas do bagaço de mandioca, com o objetivo de hidrolisar o amido residual presente no bagaço de mandioca, foram feita em erlenmeyers de 250 mL e utilizando-se uma concentração de 100 g de bagaço de mandioca/L de fase líquida. A fase líquida consistia de solução de ácido clorídrico em concentrações definidas. O tratamento com vapor foi feito em autoclave.

A otimização das condições de hidrólise foi feita utilizando planejamento experimental fatorial 3^3. Foram testados dois fatores experimentais (concentração de ácido clorídrico, temperatura e tempo de tratamento), distribuídos em três níveis. A análise dos dados foi feita por superfície de resposta através do programa

"statistica". Os valores reais e codificados das variáveis experimentais estão apresentados na tabela 6.

Cada tratamento experimental foi realizado em duplicata.

As fases líquidas foram separadas das fases sólidas por filtração e então determinado o teor de açúcar redutor solúvel, recuperado da hidrólise do amido residual presente no bagaço de mandioca.

TABELA 6. Valores das variáveis experimentais usadas no planejamento fatorial para determinação das condições ótimas de auto-hidrólise de bagaço de mandioca.

Valores Codificados	-1	0	+1	
Fatores				Unidade
Concentração de HCl	0,5	1,0	1,5	%
Temperatura	100	120	130	°C
Tempo	5	10	15	Minutos

Os resultados experimentais das planificações foram analisados de acordo com a equação:

$$Y_i = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \qquad (1)$$

Onde : Y_i = Resposta do experimento (açúcar redutor, g/L)

β_0 = Coeficiente de resposta no centro do domínio experimental

β_i = Coeficiente de resposta do fator i

x_i = Fator experimental i (unidades codificadas)

ε = Erro experimental

O hidrolisado ácido de bagaço de mandioca, mostrado na figura 23, substrato utilizado nos testes do processo fermentativo foi obtido realizando-se a hidrólise ácida do bagaço de mandioca, também mostrado na figura 23, nas condições de

tempo e temperaturas ótimas para se obter o maior rendimento possível em açúcar redutor recuperado do amido residual presente no bagaço de mandioca.

Após a determinação da concentração de açúcar redutor solúvel no hidrolisado, este era convenientemente diluído para se obter a concentração de açúcar redutor desejada para o processo fermentativo e tinha o pH ajustado para 7,0 – 7,2 com solução de NaOH 1N.

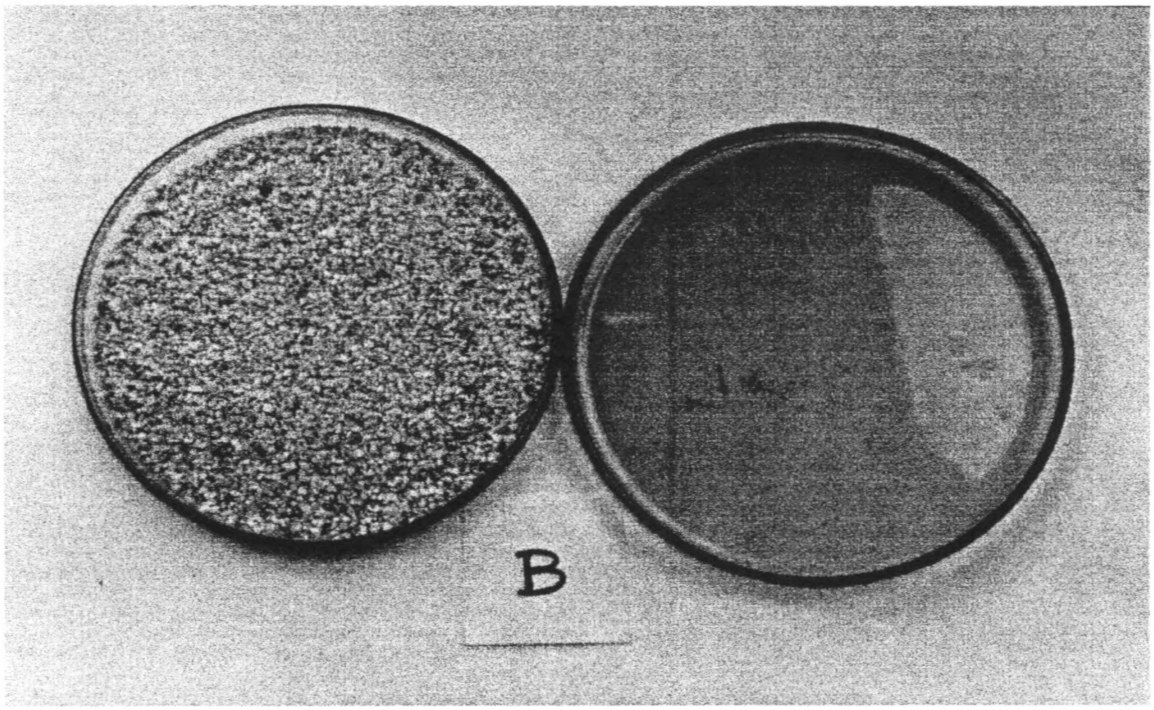


FIGURA 23. Bagaço e hidrolisado ácido de bagaço de mandioca.

O hidrolisado assim obtido foi complementado com nutrientes conforme especificado na tabela 4.

3.4.6.2 Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca

Os parâmetros físicos do processo de hidrólise enzimática do bagaço de mandioca foram otimizado no Laboratório de Processos Biotecnológicos (CARTA, 1999). O hidrolisado enzimático utilizado para os testes fermentativos de produção de goma xantana foi obtido de acordo com a metodologia descrita por CARTA, 1999.

3.5 Análises Físico-químicas Realizadas nos Hidrolisados de Casca de café

3.5.1 pH

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

3.5.2 Açúcar Redutor

As análises de açúcar redutor foram feitas em triplicata através do método colorimétrico de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), fundamentado na ação da glicose reduzindo o reativo alcalino de óxido cuproso. Este em presença do reativo arseno-molibdato de sódio (reagente de Nelson), forma um complexo azul estável de óxido de molibdênio, cuja concentração é medida por fotocolorimetria em comprimento de onda de 535 nm.

3.5.3 Cafeína

O método empregado na determinação de cafeína no hidrolisado consiste em uma extração da cafeína presente em um volume definido de material com clorofórmio em meio alcalino e comparação com a curva padrão em espectrofotômetro, na faixa do ultravioleta, em comprimento de onda de 276,5 nm. Utiliza-se clorofórmio como branco, seguindo a metodologia de análise do Instituto Adolfo Lutz.

3.5.4 Taninos

O teor de taninos do hidrolisado e do fermentado é determinado pelo método de Lowenthal, que consiste na titulação da amostra com permanganato de potássio 0,1N como solução de indicador índigo carmim. O teor de taninos é calculado pela fórmula:

$$\text{Taninos (mg /100 mL)} = \frac{(A - B) \times f \times 415,7}{V}$$

onde: A = volume de $KMnO_4$ 0,1 N gasto na titulação da amostra (ml);

B = volume de $KMnO_4$ 0,1 N gasto na titulação da prova em branco (ml);

f = fator de correção da solução de $KmnO_4$;

V = volume de amostra utilizado (ml).

3.6 Análises Físico-químicas Realizadas nos Hidrolisados do Bagaço de Mandioca

3.6.1 pH

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

3.6.2 Açúcar Redutor

Conforme item 3.5.2

3.7 As Fermentações

Os testes fermentativos foram feitos utilizando-se os hidrolisados de casca de café, e os hidrolisados de bagaço de mandioca obtido por hidrólise ácida. O hidrolisado enzimático de bagaço de mandioca foi utilizado em um teste de fermentação comparativo com o hidrolisado ácido.

As fermentações foram feitas em agitador orbital marca Tecnal, modelo TE-420, de fabricação nacional, com temperatura e agitação ajustáveis (FIGURA. 24)

Os substratos a serem testados, convenientemente diluídos, e complementados com nutrientes, 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.

FIGURA 24 . Agitador de movimento orbital usado nas fermentações.

A composição básica dos substratos está apresentada na tabela.7.

TABELA 7. Composição básica do substrato usado nas fermentações com hidrolisado de casca de café e de bagaço de mandioca.

Componente	Concentração	Unidade
Açúcar Redutor	20-50	g/L
Extrato de levedura	10	g/L
KH_2PO_4	0,1	g/L

Os frascos de Erlenmeyer com os substratos, após esterilizados foram inoculados em câmara de fluxo laminar, numa taxa de inoculo (solução semente) de 4%, e colocados em incubador-agitador de movimento orbital na temperatura de 28 - 30°C a 180rpm durante 96 horas.

A solução de inóculo era preparada e utilizada com uma concentração de 10^9 células viáveis por mL.

Foram realizadas as seguintes fermentações:

3.7.1 Fermentação com o hidrolisado de casca de café

Na primeira fermentação utilizou-se apenas o hidrolisado obtido através da auto-hidrólise da casca de café sem suplementação com fonte de nitrogênio, que permaneceu incubada por 96 horas. A seguir o meio foi suplementado com a fonte de nitrogênio. Amostras para análises foram retiradas do meio de fermentação a cada 24 horas. As fermentações foram realizadas em duplicata.

Na fermentação seguinte, utilizou-se o hidrolisado de casca de café detoxificado com carvão ativo. A fermentação foi realizada por um período de 96 horas, e amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas para análises.

3.7.2 Fermentação com o hidrolisado casca de café e de bagaço de mandioca

Neste estudo utilizou-se o hidrolisado de casca de café misturado ao hidrolisado ácido de bagaço de mandioca em proporções variáveis. Antes do preparo dos meios para fermentação, o hidrolisado de bagaço de mandioca foi diluído para ter uma concentração de açúcar redutor igual ao hidrolisado de casca de café. O tempo de fermentação também foi constante de 96 horas.

Os hidrolisados foram misturados nas proporções apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Proporção de mistura dos hidrolisados de casca de café e de bagaço de mandioca.

Proporção de mistura (%)	
Hidrolisado de casca de café	Hidrolisado ácido de bagaço de mandioca
0	100
25	75
50	50
75	25
100	0

3.7.3 Fermentação com o hidrolisado ácido e enzimático de bagaço de mandioca

Na seqüência utilizou-se apenas o hidrolisado obtido através da hidrólise ácido-térmica e da hidrólise enzimática do bagaço de mandioca, que permaneceu incubada por um tempo definido de 96 horas. Da mesma forma amostras para análises foram retiradas a cada 24 horas. A fermentação também foi realizada em duplicata.

3.7.4 Testes com fontes alternativas de nitrogênio

Nos testes seguintes foram realizados ensaios com o hidrolisado ácido de bagaço de mandioca suplementado com fontes alternativas de nitrogênio conforme especificado na TABELA 7.

Com a finalidade de se obter uma fonte alternativa de nitrogênio, para baratear e tornar mais eficiente o processo fermentativo foram testadas as seguintes fontes alternativas de nitrogênio na concentração de 10 g/L: extrato de levedura (fonte de nitrogênio padrão), peptona (fonte orgânica), nitrato de potássio (um ânion), sulfato de amônio (um cátion) e uréia.

As fermentações foram realizadas em duplicata, e o tempo total do processo fermentativo foi de 96 horas.

3.7.5 Fermentação em fermentador de bancada

Com o objetivo de verificar o comportamento do processo fermentativo em escala ampliada, foi utilizado um fermentador de bancada com volume total de 8 litros, marca Marubishi, modelo MDL, mostrado na figura 29.

Nesta fermentação foram utilizados os parâmetros otimizados de concentração de açúcar redutor, tempo de fermentação e foi utilizada a fonte de nitrogênio que possibilitou a maior produção de goma xantana, e com as melhores características.

Foram retiradas amostras do caldo fermentado com intervalos de 8 horas, para serem realizadas análises de controle do consumo de açúcar redutor, produção de biomassa e produção de goma xantana.

3.8 Análise Realizada nos Fermentados de Hidrolisados de Casca de Café

3.8.1 Açúcar Redutor Residual

As análises de açúcar redutor foram feitas em triplicata através do método colorimétrico de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), conforme item 3.5.2.

3.8.2 Cafeína

O método empregado na determinação de cafeína no fermentado consiste em uma extração da cafeína presente em um volume definido de material com clorofórmio em meio alcalino conforme item 3.5.3.

3.8.3 Taninos

O teor de taninos do fermentado é determinado pelo método de Lowenthal, conforme item 3.5.4.

3.8.4 Biomassa

Após o tempo definido de fermentação, a biomassa produzida foi determinada gravimétricamente através do peso seco. Um volume definido de fermentado foi centrifugado em tubos previamente pesados, a 10.000-12.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada marca Hitachi, modelo Himac CR 21 E, à uma temperatura de 20°C. O sobrenadante foi utilizado para as análises de açúcar redutor e goma xantana produzida. A biomassa separada foi ressuspendida com 20 mL de água destilada, novamente centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. O

sobrenadante foi descartado e a biomassa centrifugada foi seca em estufa a 80°C por 24 horas, resfriada em dessecador e pesada.

3.8.5 Goma Xantana

A goma xantana produzida durante a fermentação que se encontrava solúvel no meio fermentado, foi determinada gravimétricamente através do peso seco após precipitação com 2,5 volumes de álcool etílico. A goma Xantana precipitada foi centrifugada em tubo previamente seco e pesado, a 14.000 rpm por 50 minutos em centrifuga refrigerada marca Hitachi, modelo Himac CR 21 E, a uma temperatura de 4 °C. O Sobrenadante foi descartado e a goma xantana centrifugada foi seca em estufa a 80°C por 24 horas, resfriada em dessecador e pesada.

3.9 Análises Realizadas nos Fermentados de Hidrolisados de Bagaço de Mandioca

3.9.1 Açúcar Redutor Residual

As análises de açúcar redutor foram realizadas através do método colorimétrico de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), conforme item 3.5.2.

3.9.2 Biomassa

Conforme item 3.8.4.

3.9.3 Goma Xantana

Conforme item 3.8.5.

3.10 Cinéticas do Processo Fermentativo com o hidrolisado de bagaço de mandioca

Utilizando-se o hidrolisado ácido de bagaço de mandioca na concentração de açúcar redutor ideal, forma realizadas cinéticas do processo fermentativo com todas as fontes alternativas de nitrogênio especificadas no item 3.7.4 para se determinar o tempo ideal de fermentação.

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de hidrolisado preparado conforme item 3.4.6, convenientemente complementados com 10 g/L de cada fonte de nitrogênio e 0,1 g/L de KH_2PO_4.

Foram realizadas cinco cinéticas com o hidrolisado obtido a partir do bagaço de mandioca suplementado com as cinco fontes de nitrogênio testadas com amostras coletadas de 12 em 12 horas por 96 horas, retirando-se do agitador de movimento orbital dois frascos a cada intervalo de tempo definido, e processadas para as determinações de açúcar redutor residual por Somogyi-Nelson e goma xantana produzida por gravimetria.

A seguir foi realizada uma cinética em fermentador de bancada para avaliação do aumento de escala e da aeração mais eficiente, com amostras coletadas de 8 em 8 horas por 96 horas, retirando-se do fermentador amostras de 20 mL a cada intervalo de tempo definido, onde foram realizadas as análises açúcar redutor residual e goma xantana produzida. A partir destes dados pode-se calcular os parâmetros cinéticos dos processos através das equações abaixo:

3.10.1 Velocidade Volumétrica de formação de biomassa (r_x)

$$dX/dt = r_x = (X_2 - X_1) / (t_2 - t_1)$$

onde X_2 = Biomassa medida no tempo t_2.

X_1 = Biomassa medida no tempo t_1.

3.10.2 Velocidade Volumétrica de formação de produto (r_p)

$$dP/dt = r_p = (P_2 - P_1) / (t_2 - t_1)$$

onde : P_2 = Concentração de produto medido no tempo t_2.

P_1 = Concentração de produto medido no tempo t_1.

3.10.3 Velocidade Volumétrica de consumo do substrato (r_s)

$$dS/dt = r_s = -(S_2 - S_1) / (t_2 - t_1)$$

onde : S_2 = Concentração do substrato medido no tempo t_2.

S_1 = Concentração do substrato medido no tempo t_1.

3.11 Avaliação das Eficiências de Conversão substrato-Produto ($Y_{p/s}$)

As eficiências de conversão de açúcar redutor (substrato) em goma xantana (produto) foram avaliadas de acordo com a equação 2:

$$Y_{P/S} = (P_f) / (S_i - S_f) \quad (2)$$

Onde : P_f = quantidade de goma xantana no fermentado

S_i e S_f = quantidade inicial e final de açúcar redutor no meio

3.12 Avaliação das eficiências de conversão substrato-biomassa ($Y_{X/S}$)

As eficiências de conversão de açúcar redutor (substrato) em biomassa foram avaliadas de acordo com a equação 3:

$$Y_{X/S} = (X_f) / (S_i - S_f) \quad (3)$$

Onde : X_f = quantidade final de biomassa no fermentado

3.13 Determinação das velocidades específicas

Na fase de crescimento exponencial do microrganismo, entre os tempos t e t_f, quaisquer dentro da fase de crescimento exponencial, podem ser definidas as velocidades específicas de crescimento celular, de formação de produto e de consumo de substrato, conforme segue:

3.13.1 Velocidade específica de crescimento (Q_X)

$$Q_X = dX/dt.\ 1/X = (X_f - X) / (t_f - t) . (1/X)$$

onde X_f = Biomassa medida no tempo t_f.

X = Biomassa medida no tempo t.

3.13.2 Velocidade específica de formação de produto (Q_P)

$$Q_P = dP/dt\ .\ 1/X = (P_f - P) / (t_f - t) (1/X)$$

onde : P_f = Concentração de produto medido no tempo t_f.

P = Concentração de produto medido no tempo t.

3.13.3 Velocidade específica de consumo do substrato (Q_S)

$$Q_S = dS/dt\ .\ 1/X = -(S_f - S) / (t_f - t) . (1/X)$$

onde : S_f = Concentração do substrato medido no tempo t_f.

S = Concentração do substrato medido no tempo t.

3.14 Secagem da Goma Xantana Produzida com as Várias Fontes de Nitrogênio

Os caldos fermentados onde foram testadas as várias fontes alternativas de nitrogênio, foram submetidas ao processamento mostrado na figura 25.

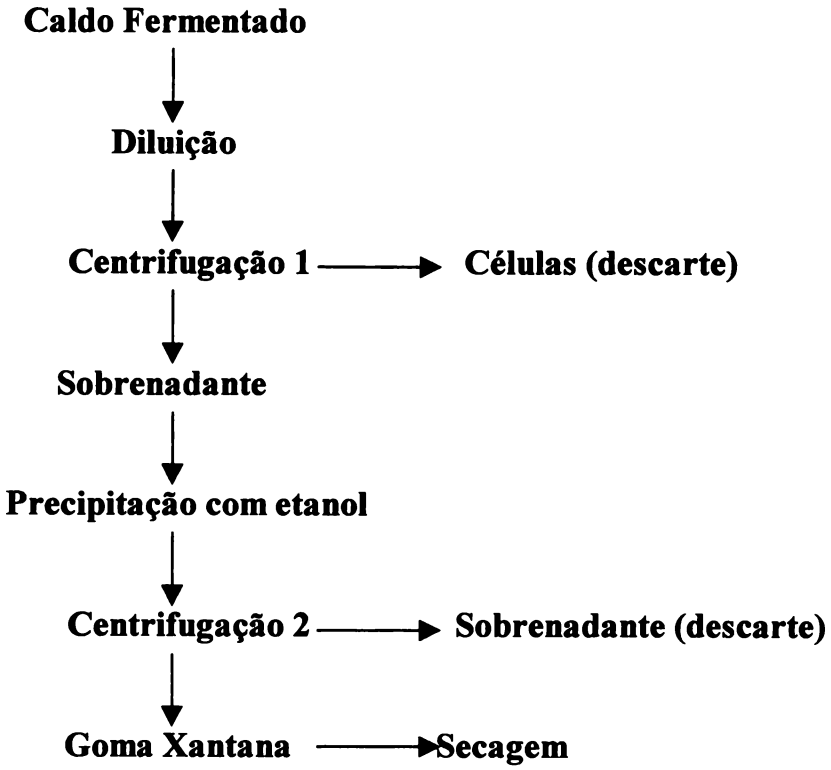


FIGURA 25. Processamento do caldo fermentado com a bactéria *X. campestris*, para obtenção da goma xantana.

Devido à viscosidade do caldo fermentado, este deve ser diluído para possibilitar a decantação das células presentes no meio.

Após diluído, a centrifugação foi feita por 15 minutos, em uma rotação de 12000 rpm, em centrifuga refrigerada marca Hitachi, modelo Himac CR 21 E. Após as células foram descartadas e a goma xantana solúvel produzida que se encontra no sobrenadante foi retirada do meio por precipitação com 2,5 volumes de etanol.

Na seqüência, a goma insolúvel foi centrifugada por 50 minutos em 14000 rpm, na temperatura de 6°C utilizando-se centrifuga refrigerada marca Hitachi, modelo Himac CR 21 E.

O sobrenadante foi descartado e a goma xantana centrifugada foi processada de acordo com o procedimento mostrado na figura 26, com a finalidade de se obter o produto puro para os testes reológicos e de infra-vermelho.

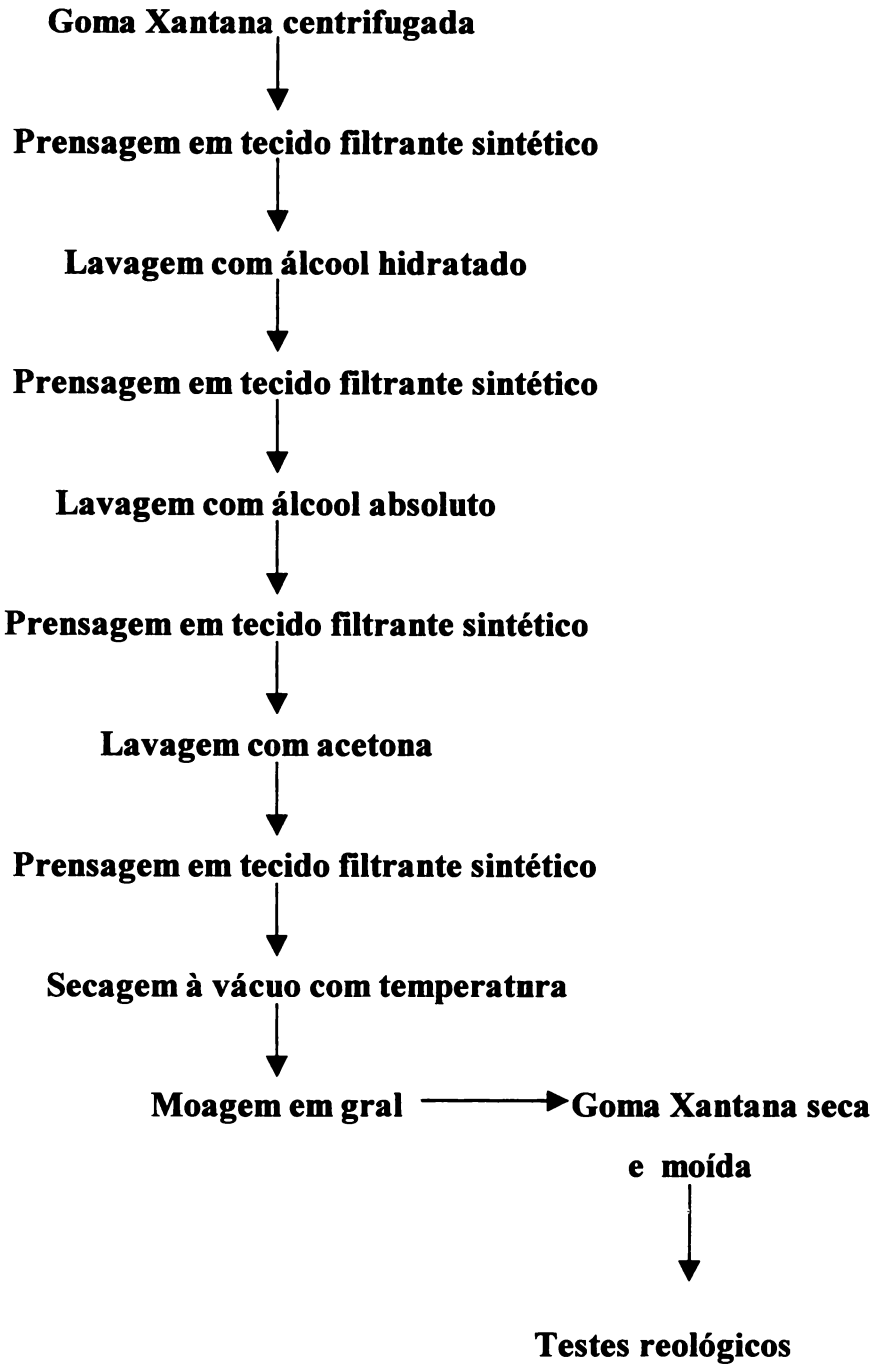


FIGURA 26. Fluxograma de obtenção da goma xantana produzida com as fontes alternativas de nitrogênio testadas, para testes reológicos e de Infra-vermelho.

3.15 Testes Reológico das Gomas Xantanas Produzidas Com as Várias Fontes de Nitrogênio Testadas

Para as análise viscosimétricas, foram preparadas soluções diluídas dos polissacarídeos obtidos com as várias fontes de nitrogênio testadas, em solução de NaCl 0,1 M, sob agitação constante em agitador magnético, utilizando aumento de temperatura quando necessário, até a completa solubilização e homogeneização do polímero.

As medições foram feitas na temperatura de 25°C, em reômetro mostrado na figura 27.

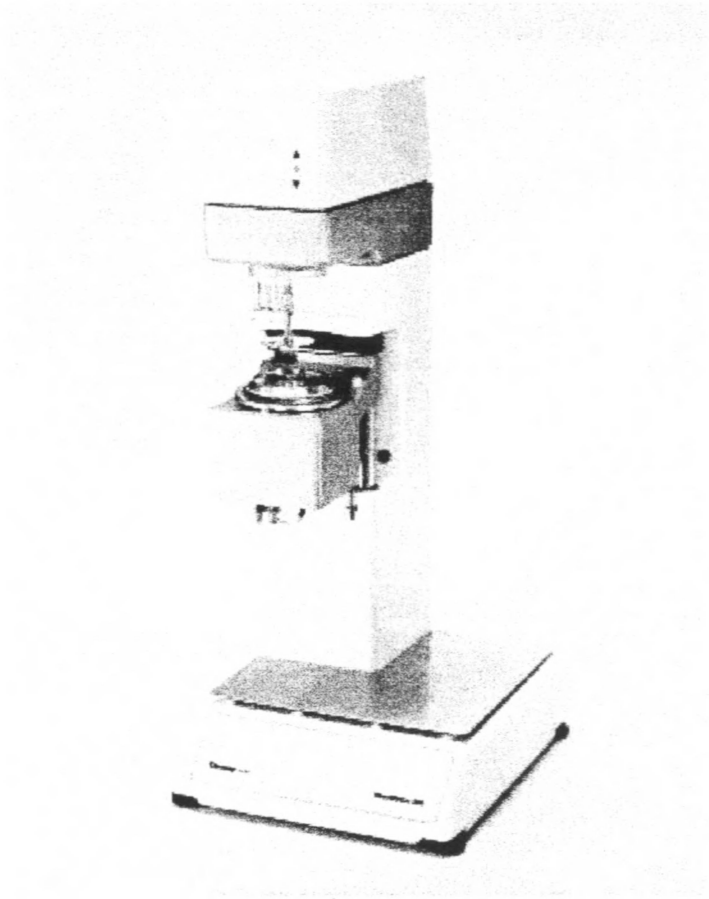


FIGURA 27. Reômetro marca HAAKE, modelo RheoWin Pro 2.67 usado na determinação da viscosidade das gomas xantanas obtidas por fermentação com o hidrolisado de bagaço de mandioca, suplementado com fontes alternativas de nitrogênio.

A concentração de polissacarídeo utilizada foi de 0,1 % ou 1 g/L, e a solubilização do polímero foi assegurada utilizando-se aquecimento.

As medidas viscosimétricas foram realizadas através do uso de reômetro marca HAAKE, modelo RheoWin Pro 2.67, do Departamento de Bioquímica da UNIVALI com cone coaxial, e diferentes spindles. Foi usado o spindle VT 550.

3.16 Espectro de infra-vermelho das Gomas Xantanas Produzidas Com as Várias Fontes de Nitrogênio Testadas

As análises de absorção na região do infra-vermelho (IR) na faixa de comprimento de onda de 500 a 4000 nm, foram realizados no Departamento de Bioquímica da UNIVALI, em aparelho BOMEM, da Hartmann & Baum-MB, mostrado na figura 28, em pastilhas de brometo de potássio (KBr).

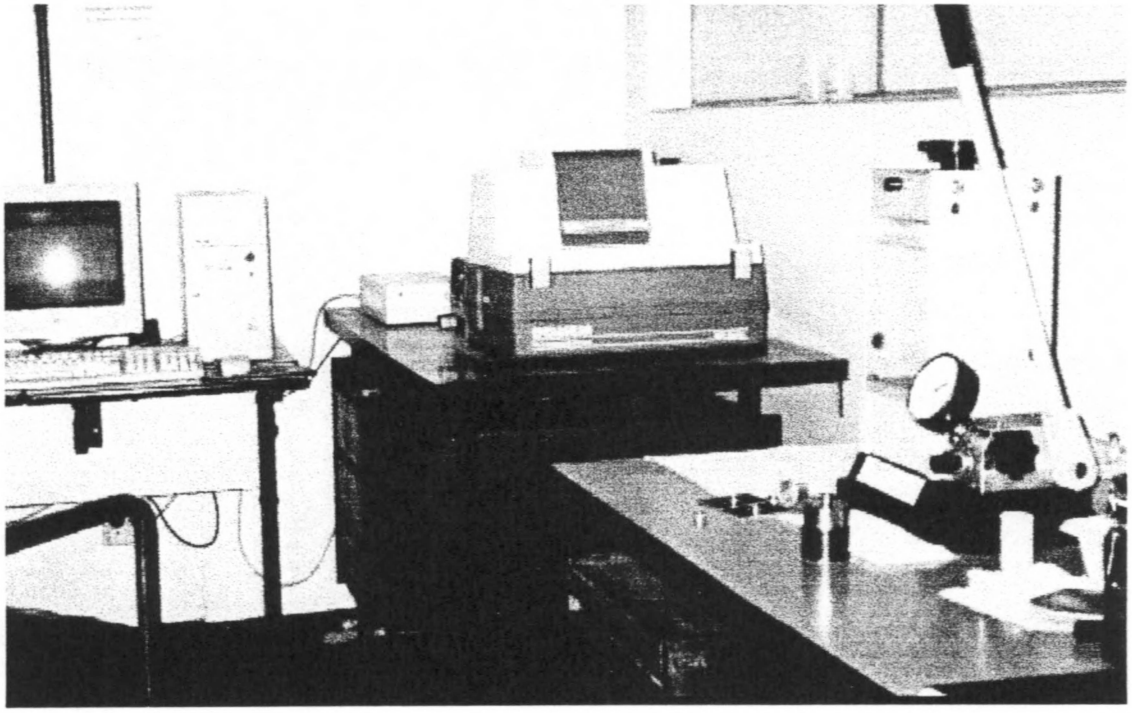


FIGURA 28. Espectrômetro marca BOMEM, usado na determinação dos espectros de absorção na região do infra-vermelho das gomas xantanas obtidas por fermentação com o hidrolisado de bagaço de mandioca, suplementado com fontes alternativas de nitrogênio.

3.17 Teste de Fermentação em Biorreator de Bancada.

Com a finalidade de confirmar a produtividade da goma xantana em escala maior, realizou-se o processo fermentativo em biorreator de bancada, marca Marubishi, modelo MDL com volume total de 8 L. No ensaio realizado foi utilizado um volume útil de 3,5 L. O fermentador dispõe de controle de temperatura, agitação e aeração. O meio, hidrolisado ácido de bagaço de mandioca, foi suplementado com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio e KH_2PO_4, nas concentrações mostradas na tabela 4, e o biorreator está mostrado na figura 29.

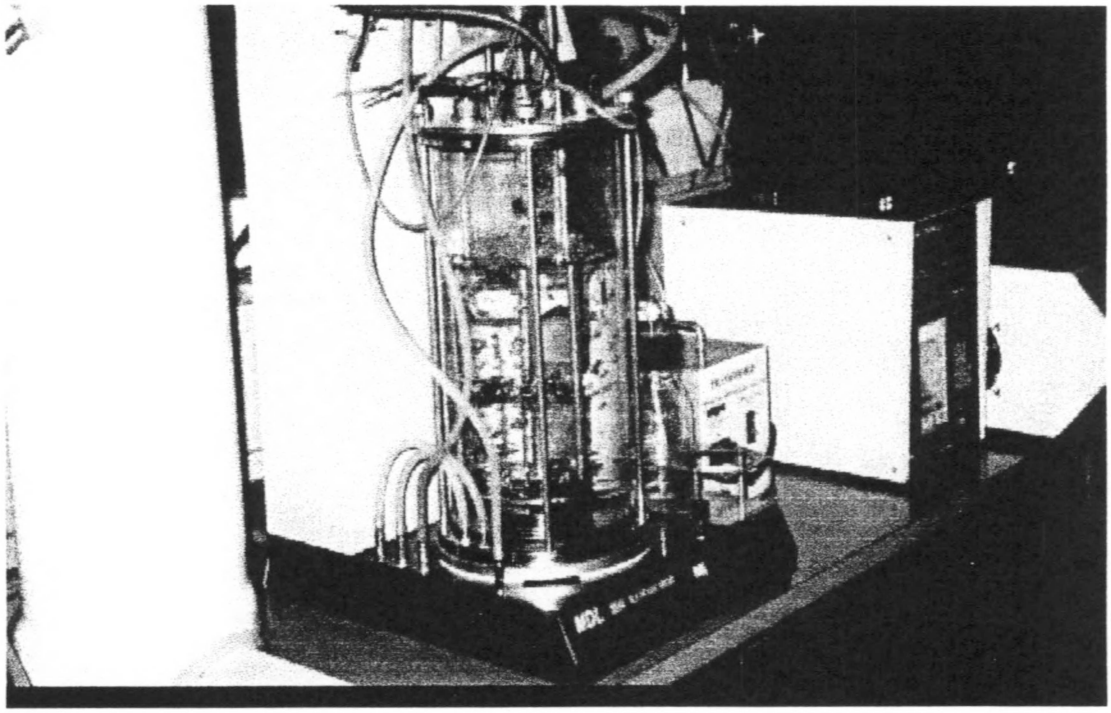


FIGURA 29. Biorreator de bancada marca Marubishi, modelo MDL, usado na determinação dos parâmetros cinéticos.

3.18 Teste de Secagem da Goma Xantana em secador pulverizador

Os testes de secagem em secador-pulverizador, spray-drier, foram realizados com uma solução 0,2 % preparada em água destilada com a goma xantana produzida nos teste com o reator de bancada, onde foi utilizado nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.

Para os testes de secagem da goma xantana, foi utilizado o secador-pulverizador de laboratório, mostrado na figura 30, marca Lab-Plant, modelo SD-05, instalado na Usina Piloto do Curso de Engenharia de Alimentos da PUCPR.

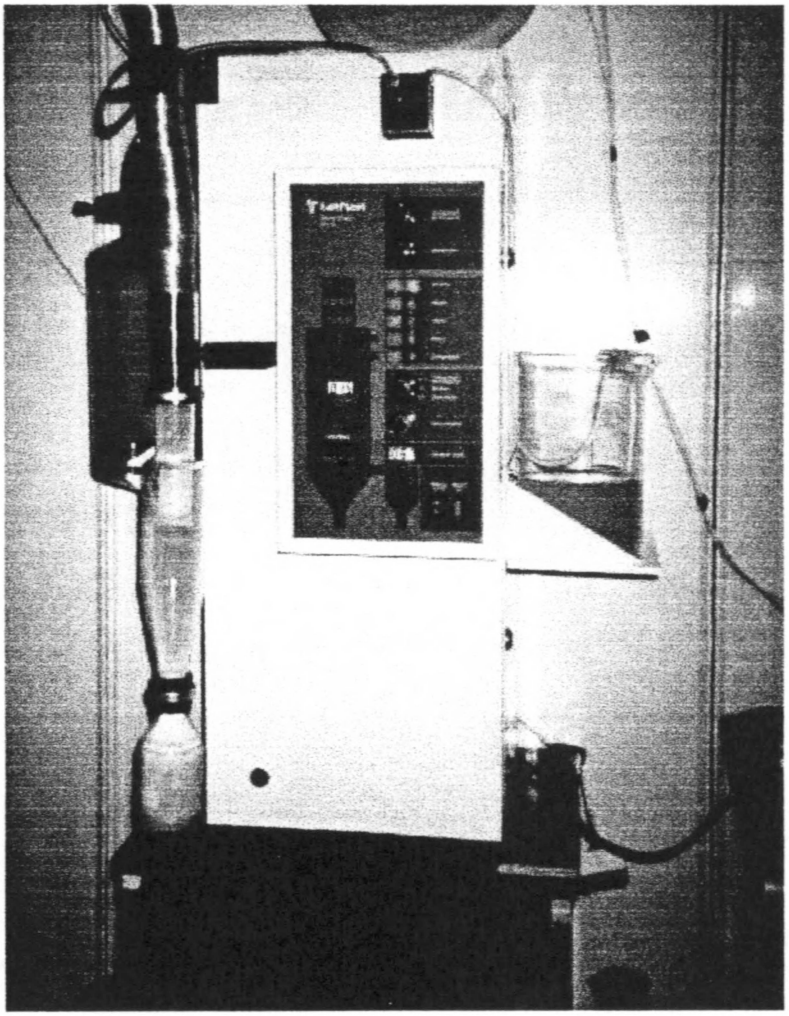


FIGURA 30. Secador-pulverizador de bancada, marca Lab-Plant, modelo SD-05, usado nos testes de secagem da goma xantana produzida por fermentação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição centesimal da casca de café

A casca de café é um resíduo gerado no processamento do café. Devido á grande quantidade de resíduo produzido por quilo de produto beneficiado e pronto para consumo, aproximadamente 1 quilo de resíduo por quilo de produto, este material a ser descartado se torna muito importante. A composição das cascas de café varia muito dependendo da origem, das condições de cultivo, da variedade de café, do grau de maturação das cerejas e do processamento utilizado no beneficiamento do café. Para conhecer previamente as características do material disponível para o estudo, foi feita a determinação da composição centesimal da casca de café. A tabela 9 apresenta os resultados obtidos:

TABELA 9. Características Físico-Químicas da casca de café utilizada, em g/100g de matéria seca.

Componente	Composição g/100 g
Nitrogênio Total	6,75
Lipídeos	1,75
Fibras	30,16
Cinzas	11,55
Açúcares Redutores	23,55
Açúcares Totais	35,10
Cafeína	1,1
Taninos	9,10

Os dados obtidos na determinação das características da casca de café disponível para estudos, mostram que, o material apresenta alto teor de fibras, atribuído à celulose e hemicelulose presente nas cascas. O alto teor de açúcar,

que pode ser utilizado como fonte de energia no metabolismo de microrganismos, mostra que a casca de café pode ser aproveitada em processos fermentativos, tanto no estado sólido quanto na forma de hidrolisados onde estes açúcares passariam a estar solubilizados. O nitrogênio presente nas cascas vem em parte da cafeína, que possui 26,38 % de nitrogênio, e em parte das proteínas presentes no meio. Este nitrogênio só pode ser aproveitado no metabolismo microbiano se estes compostos forem degradados pelos microrganismos. Estes dados estão de acordo com BRAND, 1999.

Os valores nutricionais evidenciados na determinação da composição físico química da casca de café sugerem que este resíduo pode ser utilizado na elaboração de ração animal, entretanto os teores de cafeína e taninos são os limitantes para esta aplicação devido ao efeito tóxicos destes compostos. Taninos, principalmente, são compostos fenólicos tóxicos, não recomendados na dieta de animais (BRAND et al., 2000).

4.2 Auto-Hidrólise da casca de café

A casca de café, resíduo do processamento da fruta, na granulometria selecionada, foi analisada e submetida ao processo de hidrólise para disponibilizar em fase líquida os açúcares presentes na fase sólida. A hidrólise consiste em submeter o material sólido a um tratamento térmico por tempos definidos. As condições físicas de hidrólise foram otimizadas, com o objetivo de se determinar a temperatura e o tempo de hidrólise que possibilitem a melhor recuperação de açúcar, ou seja, a maior concentração de açúcar redutor no meio líquido após o tratamento térmico. Com condições brandas de hidrólise, a eficiência de recuperação de açúcar é baixa. Com condições muito severas pode ocorrer a degradação dos açúcares a compostos indesejáveis, ou perda de tempo e energia.

4.2.1 Planificação experimental 1: 3^2

Nesta planificação experimental dois fatores experimentais foram escolhidos para serem testados: tempo e temperatura de hidrólise distribuídos em três níveis para cada fator, o nível baixo (-1), o nível médio (0) e o nível alto (+1). O experimento foi completo e sem repetição. Os fatores com seus valores reais e codificados estão na tabela 5. O pH foi medido antes e no final de cada tratamento e estão apresentados na tabela 10.

TABELA 10. pH dos hidrolisados de casca de café antes e depois dos tratamento térmicos realizados.

Tempo (min.)	Temperaturas		
	100°C	120°C	140°C
0	4,4	4,4	4,4
5	4,3	4,6	4,3
10	4,4	4,6	4,4
15	4,7	4,6	4,7

Observa-se na tabela 10, que quando as cascas de café desidratadas são colocadas em água, o pH da suspensão é baixo, indicando que o material tem caráter ácido devido ao ácido cafeico, clorogênico e outros que estão presentes na fruta, além de ácidos que se formam pela ação de microrganismos que naturalmente estão presentes na fruta, principalmente bactérias láticas, que fermentam os açúcares com produção de ácidos. Ao final do processamento térmico, houve um aumento discreto do pH dos hidrolisados, indicando que pode ter havido a degradação de uma parte dos ácidos presentes no início do processo.

A variável resposta medida ao final de cada tratamento foi a concentração de açúcar redutor e os resultados estão apresentados na tabela 11.

Os resultados obtidos de concentração de açúcar redutor nos hidrolisados foram submetidos à análise estatística por superfície de resposta para se verificar a significância dos fatores experimentais nos níveis testados, e a variação da variável resposta em função dos fatores experimentais testados.

TABELA 11. Concentração de açúcar redutor em g/L nos hidrolisados obtidos no tratamento térmico da casca de café.

Tempo (min.)	Temperatura		
	100°C	120°C	140°C
5	37,6	31,1	39,1
10	36,8	44,3	40,6
15	42,8	47,5	35,7

A análise através do gráfico Pareto mostrado nas figuras 31, e 32, e da análise de variância, ANOVA mostrada na tabela 12, fornece os níveis de significância de cada fator experimental testado.

Observa-se pelo gráfico Pareto mostrado na figura 32, que ao nível de significância de 5%, nenhum dos fatores experimentais testados apresentou-se significativo. Entretanto, dos fatores experimentais testados, o fator mais importante no processo é o fator tempo, bem como a interação entre o fator tempo e o fator temperatura, e na seqüência a temperatura de hidrólise. A temperatura por si não é um fator significativo no processo de obtenção dos hidrolisado de casca de café. Isto significa que a temperatura não define o processo, ou seja, na faixa de trabalho testada, as variações nos resultados foram muito maiores, quando houve variação no tempo e menos significativas para as variações de temperatura.

Os resultados obtidos no gráfico Pareto com relação aos fatores experimentais significativos estão confirmados na tabela 12, onde estão mostrados os dados da Análise de Variância. A ANOVA mostra que os fatores tempo e temperaturas de hidrólise não são significativos ao nível de 5 % de significância. Isto significa que na faixa experimental testada, a variação na concentração de açúcares redutores nos hidrolisados não apresentou uma variação significativa.

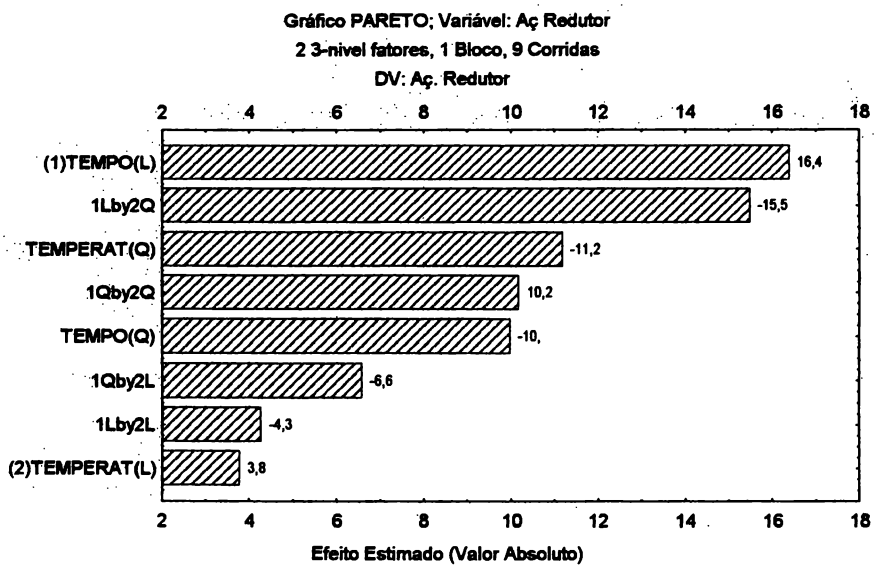


FIGURA 31. Gráfico Pareto para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de casca de café submetida a tratamento térmico por tempos definidos referente à planificação experimental 1, considerando-se interações de primeira e de segunda ordem.

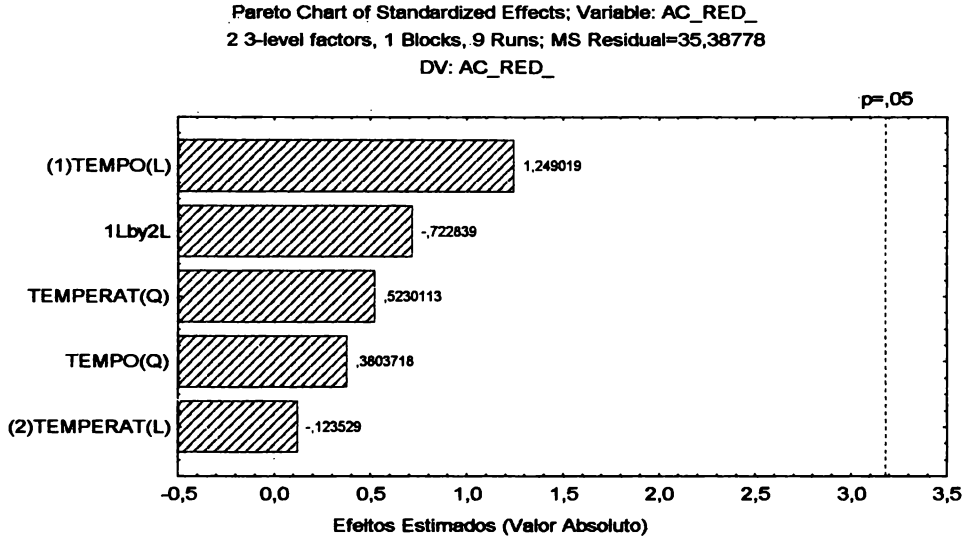


FIGURA 32. Gráfico Pareto para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de casca de café submetida a tratamento térmico por tempos definidos referente à planificação experimental 1, considerando-se apenas interações de primeira ordem.

TABELA 12. ANOVA para a concentração de açucares redutores recuperados da casca de café no planejamento experimental 1.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão F	p
(1) Tempo (L+Q)	60,3267	2	30,16333	0,852366	0,509190 ^{ns}
(2) Temperatura (L+Q)	10,2200	2	5,11000	0,144400	0,871216 ^{ns}
(1) c/ (2)	18,4900	1	18,49000	0,522497	0,522035 ^{ns}
Erro	106,1633	3	35,38778		
Total SS	195,2000	8			

$R^2 = 0,45613$

Onde

R^2 = fator de correlação para o ajuste dos dados obtidos à superfície calculada.

F = razão entre a variabilidade entre amostras e a variabilidade dentro da amostra.

P = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

^{s} = significativo ; ^{ns} = não significativo

Nas figuras 33 e 34, estão mostrados os gráficos de superfície de resposta e de contorno para os resultados de concentração de açúcares redutores nos hidrolisados de casca de café em função dos fatores experimentais testados.

Dos resultados obtidos e dos gráficos mostrados nas figuras 33 e 34, observa-se que temperaturas em torno de 120°C e tempo de tratamento de 12 a 14 minutos, é a condição mais favorável para o preparo do hidrolisado de casca de café, objetivando a recuperação de açúcares redutores, nas faixas de tempo e temperaturas testadas.

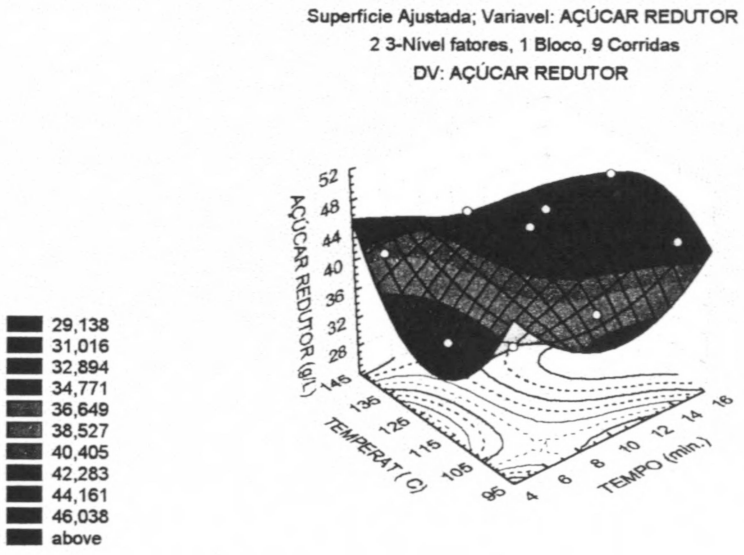


FIGURA 33. Superfície de resposta da concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de casca de café, em função da temperatura e do tempo de hidrólise.

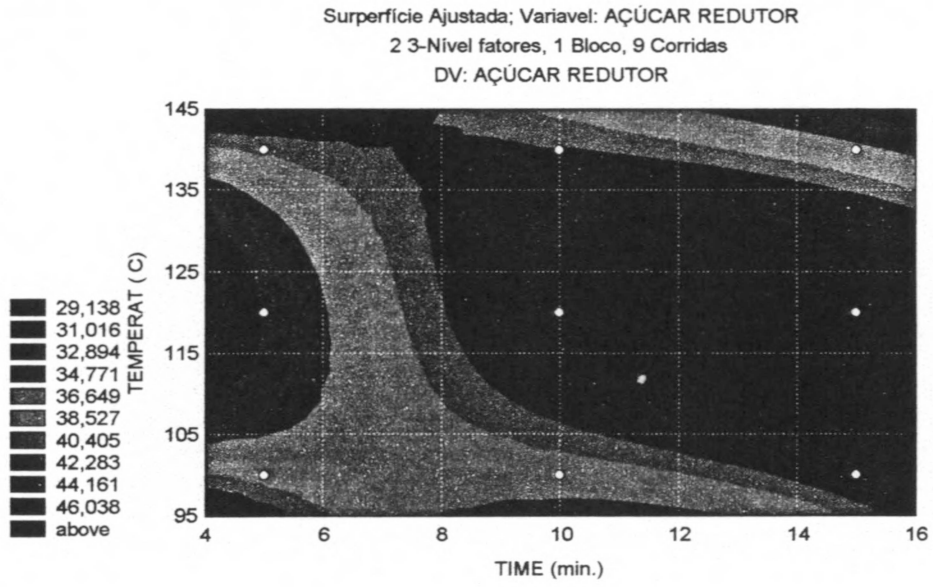


FIGURA 34. Gráfico de contorno da concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de casca de café, em função da temperatura e do tempo de hidrólise.

A diminuição da concentração de açúcares redutores nos hidrolisados obtidos a 140°C, mostra que em temperaturas mais altas pode estar ocorrendo a degradação de açúcares solúveis, por outro lado, em temperaturas mais baixas, em torno de 100°C, a extração dos açúcares e o processo de hidrólise ocorre de forma parcial, nos tempos testados (WOICIECHOWSKI et al., 2000).

Tomando-se o melhor resultado obtido para o cálculo do rendimento do processo, tem-se que 47,3 g de açúcares redutores foram obtidos por litro de hidrolisado, na temperatura de 120°C e tempo de tratamento de 10 minutos, ou seja 47,3 g/L de açúcares redutores recuperados no hidrolisado a partir de 200 g/L de cascas de café, ou ainda 236,5 g de açúcares redutores por kg de cascas de café. Considerando-se que a casca de café utilizada apresenta um teor de açúcar total de 35,1%, esta fração de açúcar recuperada, significa 67,38% de recuperação dos açúcares totais presentes na casca de café.

4.3 Composição centesimal do Bagaço de Mandioca

O bagaço de mandioca é o resíduo sólido gerado no processamento das raízes de mandioca. Devido ao alto teor de amido não extraído no processamento da raiz de mandioca, este resíduo se torna uma fonte importante de carbono para processos fermentativos. Açúcar redutor viável para a utilização por microrganismos é obtido através de hidrólise. A composição geral do bagaço de mandioca não varia muito dependendo da origem, entretanto o teor de amido pode variar dependendo da sofisticação do processamento industrial, mas em geral é bastante alto. Para conhecer previamente as características do material disponível para o estudo, foi feita a determinação da composição centesimal do bagaço de mandioca. A tabela 13 apresenta os resultados obtidos.

Os teores de nitrogênio e de lipídeos são baixos, bem como o teor de fibras, este provavelmente de origem celulósica. Entretanto os dados obtidos mostram que o bagaço de mandioca apresenta um alto teor de amido. Isto torna este resíduo um substrato potencialmente importante para processos biotecnológicos.

TABELA 13. Composição centesimal do bagaço de mandioca (g/100 g).

Componentes	g/100 g	g/100 g mat. seca
Umidade	8,50	0,00
Nitrogênio	1,52	1,66
Lipideos	0,53	0,58
Fibras	21,10	23,08
Cinzas	1,50	1,64
Amido	66,00	72,19

O amido presente no bagaço de mandioca hidrolisado produz glicose, monossacarídeo diretamente fermentescível e viável para o metabolismo microbiano. Os dados da tabela 13 estão de acordo com PANDEY et al., 2001.

4.4 Hidrólise ácida do bagaço de mandioca

O bagaço de mandioca, resíduo do processamento das raízes de mandioca, na granulometria selecionada, foi analisada e submetida ao processo de hidrólise para disponibilizar em fase líquida o polissacarídeo, basicamente amido, presente na fase sólida. A hidrólise consiste em submeter o material sólido a um tratamento térmico por tempos definidos, com agente ácido para possibilitar a hidrólise. As condições físicas de hidrólise foram otimizadas, com o objetivo de se determinar a melhor concentração do ácido usado, temperatura e o tempo de hidrólise que possibilitem a melhor recuperação de açúcar, ou seja, o maior concentração de açúcar redutor no meio após o tratamento térmico.

4.4.1 Planificação experimental 2: 3^3

A variável resposta medida ao final de cada tratamento foi a concentração de açúcar redutor e os resultados estão apresentados na tabela 14.

TABELA 14. Planificação experimental para otimizar as condições físicas de hidrólise ácida do bagaço de mandioca para a recuperação de açúcares.

Concentração de HCl (%)	Temperatura (°C)	Tempo de hidrólise (minutos)	Açúcar Redutor (g/L)
0,5	100	5	3,84
0,5	100	10	8,00
0,5	100	15	12,76
0,5	120	5	39,41
0,5	120	10	41,09
0,5	120	15	51,66
0,5	130	5	29,7
0,5	130	10	34,5
0,5	130	15	39,02
1,0	100	5	6,00
1,0	100	10	10,17
1,0	100	15	14,50
1,0	120	5	47,09
1,0	120	10	62,55
1,0	120	15	53,36
1,0	130	5	35,5
1,0	130	10	37,5
1,0	130	15	40,00
1,5	100	5	5,55
1,5	100	10	12,00
1,5	100	15	20,23
1,5	120	5	57,74
1,5	120	10	49,68
1,5	120	15	48,75
1,5	130	5	41,34
1,5	130	10	42,00
1,5	130	15	41,41

Nesta planificação experimental três fatores experimentais foram testados: concentração de ácido clorídrico, tempo e temperatura de hidrólise distribuídos em três níveis para cada fator, o nível baixo (-1), o nível médio (0) e o nível alto

(+1). O experimento foi completo e sem repetição. Os fatores com seus valores reais e codificados estão na tabela 6.

Os resultados obtidos para a concentração de açúcares redutores recuperados do bagaço de mandioca, na hidrólise ácida, foram submetidos à análise estatística por superfície de resposta para se verificar quais os fatores experimentais mais significativos no processo para a variável resposta, e como a variável resposta varia em função destes fatores.

A análise através do gráfico Pareto, mostrada na figura 35 a seguir, mostra quais são os fatores experimentais mais significativos no processo.

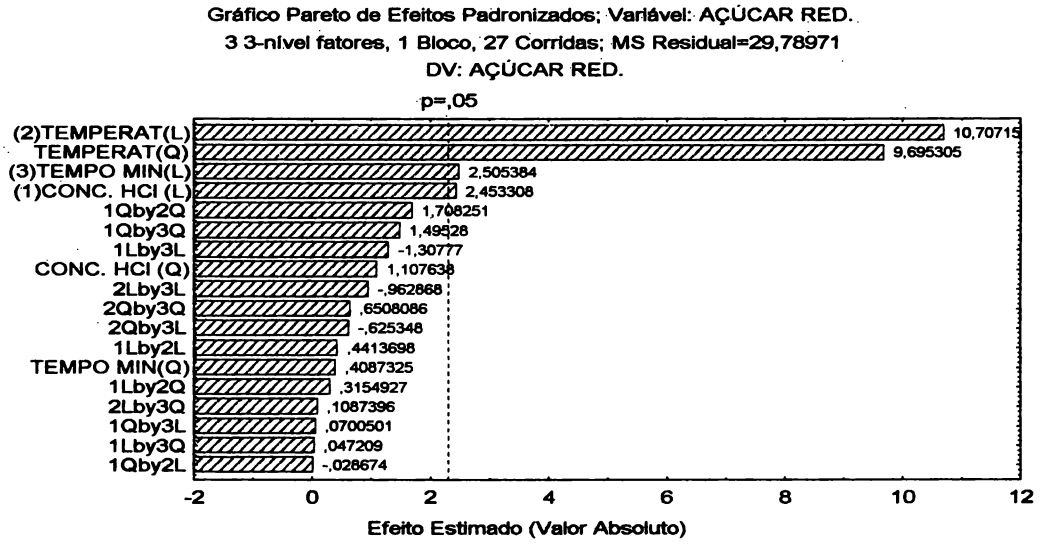


FIGURA 35. Gráfico Pareto para a concentração de açúcares redutores nos hidrolisados de bagaço de mandioca submetidos à concentração de ácido, tempos e temperatura de hidrólise variáveis, referente à planificação experimental 2.

A partir do gráfico Pareto para a concentração de açúcares redutores, que mostra a proporção de influencia de cada fator experimental na variável resposta, pode-se concluir que ao nível de significância de 5%, a temperatura de hidrólise é o fator mais importante na definição da eficiência do processo. Tempo de hidrólise e concentração de ácido clorídrico, também são fatores significantes no processo.

Os dados de açúcares redutores recuperados obtidos foram submetidos à análise de variância, obtendo-se a tabela ANOVA apresentada na tabela 15.

TABELA 15. ANOVA para a concentração de açucares redutores recuperados do bagaço de mandioca no planejamento experimental 2.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Valor p
(1) Conc. HCl (L)	179,296	1	179,296	6,0187	0,039731 ^{s}
Conc. HCl (Q)	36,548	1	36,548	1,2269	0,300206 ^{ns}
(2) Temperatura (L)	3415,181	1	3415,181	114,6430	0,000005 ^{s}
Temperatura (Q)	2800,201	1	2800,201	93,9989	0,000011 ^{s}
(3) Tempo (L)	186,988	1	186,988	6,2769	0,036633 ^{s}
Tempo (Q)	4,977	1	4,977	0,1671	0,693459 ^{ns}
1 L c/ 2 L	5,803	1	5,803	0,1948	0,670631 ^{ns}
1 L c/ 2 Q	2,965	1	2,965	0,0995	0,760461 ^{ns}
1 Q c/ 2 L	0,024	1	0,024	0,0008	0,977827 ^{ns}
1 Q c/ 2 Q	86,930	1	86,930	2,9181	0,125969 ^{ns}
1 L c/ 3 L	50,948	1	50,949	1,7103	0,227280 ^{ns}
1 L c/ 3 Q	0,66	1	0,66	0,0022	0,963504 ^{ns}
1 Q c/ 3 L	0,146	1	0,146	0,0049	0,945873 ^{ns}
1 Q c/ 3 Q	66,606	1	66,606	2,2359	0,173204 ^{ns}
2 L c/ 3 L	27,619	1	27,619	0,9271	0,363811 ^{ns}
2 L c/ 3 Q	0,352	1	0,352	0,0118	0,916087 ^{ns}
2 Q c/ 3 L	11,650	1	11,650	0,3911	0,549161 ^{ns}
2 Q c/ 3 Q	12,617	1	12,617	0,4236	0,533412 ^{ns}
Error	238,318	8	29,79		
Total	8581,351	26			
R^2	0,97223				

Onde

R^2 = fator de correlação para o ajuste dos dados obtidos à superfície calculada.

F = razão entre a variabilidade entre amostras e a variabilidade dentro da amostra.

P = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

^{s} = significativo ; ^{ns} = não significativo

O coeficiente de correlação obtido nesta análise (R^2 = 0,97223) é satisfatório para este tipo de experimento. Confirmando os resultados obtidos na análise da variável resposta por Pareto, os parâmetros significativos ao nível de significância de 5% foram, a concentração de ácido clorídrico e o tempo de hidrólise e a temperatura aparece com uma influencia muito acentuada no processo.

As superfícies de resposta e os gráficos de contorno para a variável resposta, concentração de açúcares redutores nos hidrolisados, estão apresentados nas figuras 36 e 37 seguir, mostrando a variação da variável resposta em função da concentração de ácido utilizada e do tempo de hidrólise.

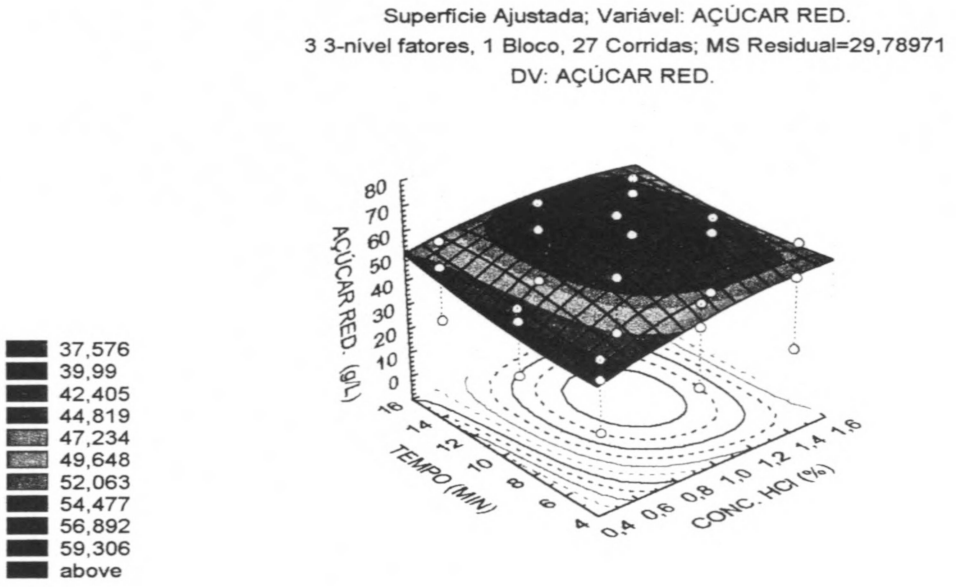


FIGURA 36. Superfície de resposta da concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da concentração de HCl utilizada e do tempo de hidrólise.

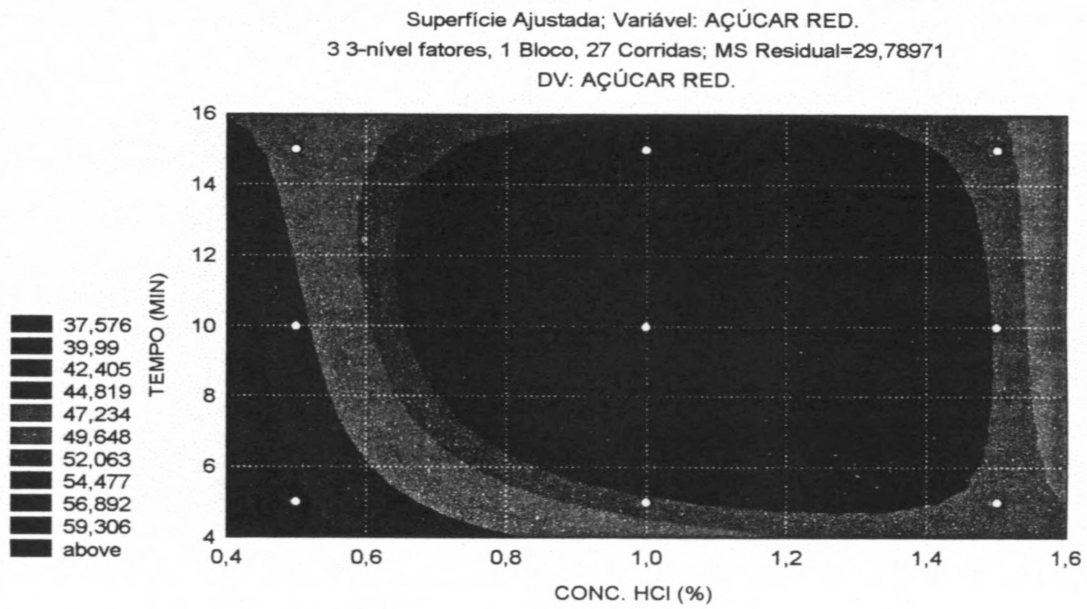


FIGURA 37. Gráfico de contorno da concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da concentração de HCl utilizada e do tempo de hidrólise.

Estes gráficos de superfície de resposta e de contorno, mostram que na faixa testada a melhor recuperação de açúcares redutores é atingida quando a hidrólise é feita em meio ácido com concentração de 1 a 1,2%, e o processo de hidrólise é feito por um tempo de 10 a 12 minutos. Nestas condições a concentração de açúcar redutor no hidrolisado recuperado do bagaço de mandioca, é maior que de 59,306 g/L.

As figuras 38, 39, 40 e 41 a seguir, mostram os gráficos de superfície de resposta e de contorno da variação da variável resposta, a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da temperatura, da concentração de ácido utilizada e do tempo de hidrólise.

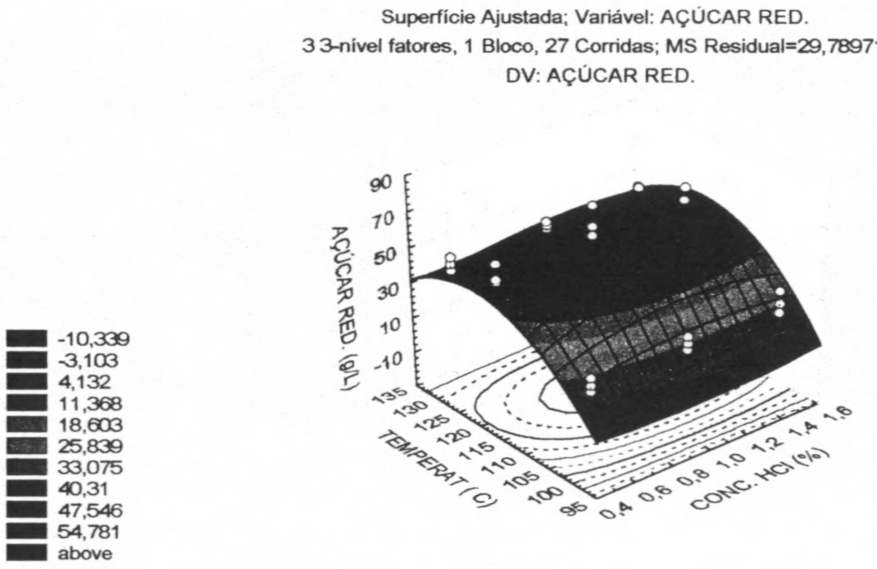


FIGURA 38. Superfície de resposta para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da temperatura e da concentração de HCl utilizada na hidrólise.

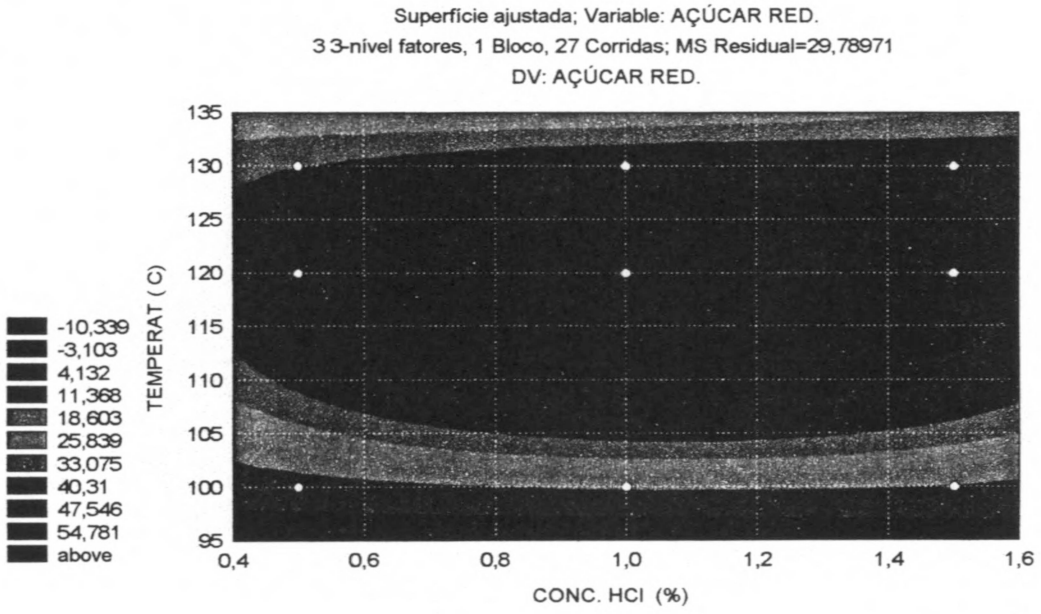


FIGURA 39. Gráfico de contorno para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da temperatura e da concentração de HCl utilizada na hidrólise.

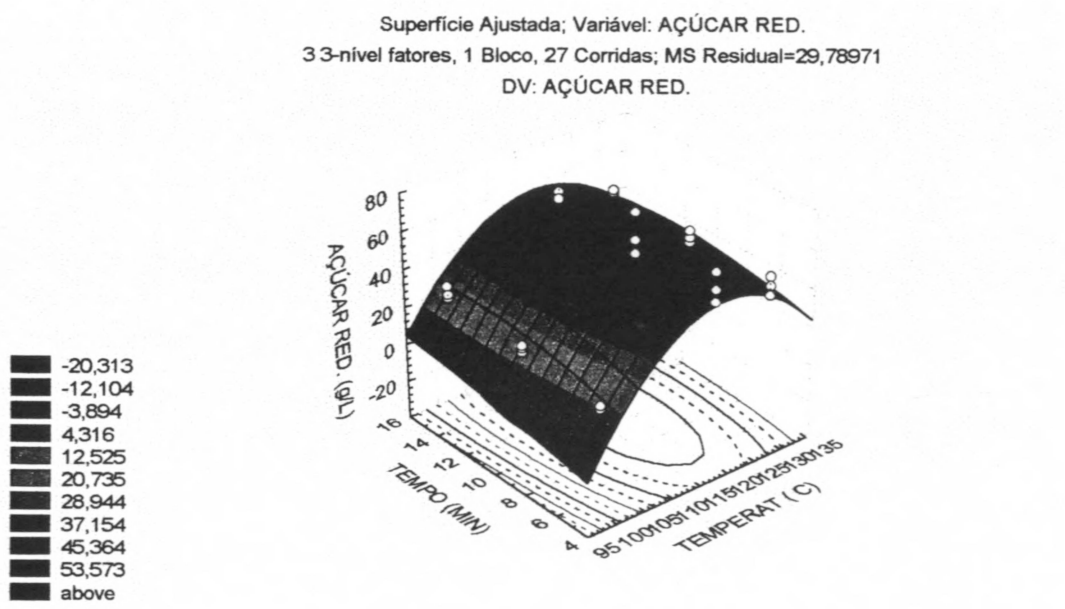


FIGURA 40. Superfície de resposta para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da temperatura e do tempo de hidrólise.

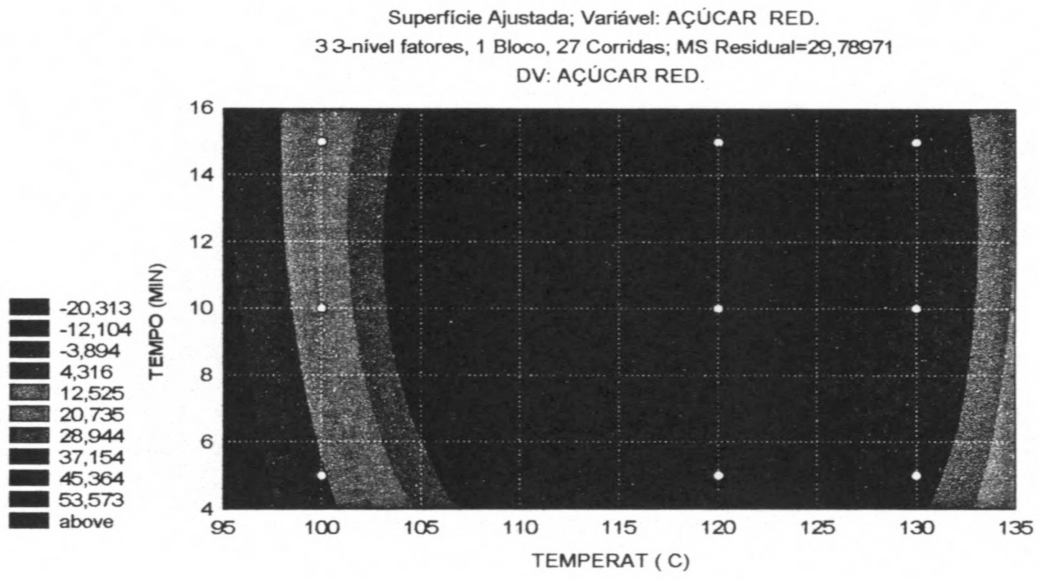


FIGURA 41. Gráfico de contorno para a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados de bagaço de mandioca, em função da temperatura e do tempo de hidrólise.

As figuras 38, 39, 40 e 41, confirmam que a melhor concentração de ácido clorídrico para o processo de hidrólise ácida do bagaço de mandioca é de 1,0 a

1,2%. Da mesma forma está confirmada que a hidrólise feita por um tempo de 10 a 12 minutos conduz à melhor recuperação de açúcares redutores.

De acordo com as figuras, 39 e 41, pode-se determinar que a temperatura de processo que leva à melhor recuperação de açúcares redutores é a temperatura de 120°C.

Este estudo definiu as melhores condições físicas para a hidrólise ácida do bagaço de mandioca. Nas condições físicas definidas, temperatura de 120°C, tempo de hidrólise de 10 a 12 minutos e concentração de ácido clorídrico de 1 a 1,2 %, a melhor recuperação foi de 62,55 g/L de açúcar redutor a partir de 100 g/L de bagaço de mandioca. Considerando-se que o teor de amido do bagaço de mandioca utilizado foi determinado em 66 %, a recuperação de açúcar redutor foi de 94,77 %.

4.5 Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca

Conforme determinado por CARTA, 1999, a otimização das condições físicas da hidrólise enzimática do bagaço de mandioca, envolve vários passos. O primeiro passo da hidrólise consiste em uma pré-gelatinização do amido residual do bagaço. A gelatinização ocorre submetendo-se o bagaço de mandioca à temperatura de 100°C por 15 minutos. Na seqüência, a hidrólise propriamente dita ocorre em duas etapas:

A primeira etapa usando 100 μL da enzima α-amylase Termamyl 120L da Novo Nordisk por grama de amido presente no bagaço. Nesta etapa o pH do meio deve ser de 6,5, e o material é mantido por 1 hora na temperatura de 90°C.

A segunda etapa usando 471 μL da enzima amiloglucosidase AMG 200L da Novo Nordisk por grama de amido presente no bagaço. Para esta etapa o pH deve ser ajustado para 4,5 e o bagaço deve ser mantido por 24 horas na temperatura de 60°C.

Após a hidrólise, as enzimas ativas presentes no meio devem ser inativadas. A inativação é feita aumentando a temperatura do meio para 100°C, por 10 minutos.

Este estudo definiu as melhores condições físicas bem como as quantidades de enzima usadas para a hidrólise enzimática do amido presente no bagaço de mandioca. Nas condições físicas otimizadas, a melhor recuperação foi de 77,1 g/L de açúcar redutor a partir de 120 g/L de bagaço de mandioca. Considerando-se que o teor de amido do bagaço de mandioca utilizado foi determinado em 66 %, a recuperação de açúcar redutor foi de 97,3 %.

4.6 Comparação Entre a Hidrólise Ácida e Enzimática do Bagaço de Mandioca

Considerando-se o tempo necessário para ambos os processos para uma batelada, a hidrólise ácida é feita em 10 minutos, enquanto que a hidrólise enzimática necessita de 25 horas e 25 minutos (15 minutos para a pré-gelatinização, 1 hora com a enzima α-amilase, 24 horas com a enzima amiloglucosidase e 10 minutos para a inativação das enzimas), a hidrólise ácida é mais vantajosa, pois produz substrato viável para utilização em um tempo muito menor.

O custo de produtos químicos utilizados, considerando-se uma batelada onde 150 kg de bagaço de mandioca é hidrolisado, pode ser avaliado conforme mostrado nas tabelas 16 e 17, onde estão apresentados os custos de produtos químicos necessários para ambos os processos.

TABELA 16. Preços e produtos químicos para a hidrólise ácida de 150 kg de bagaço de mandioca.

Produto Químico	Concentração %	Quantidade kg	Preço US$/kg	Preço Total US$
HCl	37	46,96	0,3	14,09
NaOH (neutral.)	100	19,04	1,06	20,18
Total				34,27

TABELA 17. Preços e produtos químicos para a hidrólise enzimática de 150 kg de bagaço de mandioca.

Produto Químico	Concentração %	Quantidade kg	Preço US$/kg	Preço Total US$
Termamyl 120 L	100	11,88	11,55	137,21
AMG 200L	100	55,95	41,70	2333,11
HCl até pH 4.5	37	0,979	0,3	0,29
NaOH (neutral.)	100	0,360	1,06	0,38
Total				2470,99

Considerando-se que a recuperação de açúcares redutores é semelhante para ambos os processos, os dados de custo com produtos químicos necessários e o tempo gasto nos dois processos mostram que a hidrólise ácida apresenta-se como uma boa alternativa de processamento para a obtenção de açúcares redutores diretamente fermentescíveis do amido residual presente no bagaço de mandioca, com vistas à recuperação de açúcares redutores.

4.7 Comparação da fermentação com o hidrolisado ácido e enzimático de bagaço de mandioca.

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos na fermentação com o hidrolisado ácido e enzimático de bagaço de mandioca, para verificar se a concentração salina do meio, maior no hidrolisado ácido, não inibe o processo fermentativo, foram realizadas fermentações com os dois hidrolisados. O hidrolisado ácido foi obtido nas condições operacionais otimizadas no item 4.4 e o hidrolisado enzimático foi obtido nas condições otimizadas por CARTA, 1999.

As fermentações foram realizadas em condições idênticas, e os resultados obtidos de biomassa e goma xantana produzidas e de açúcar redutor consumido estão na figura 42.

Os resultados da figura 42, referente aos dados da fermentação com os hidrolisados ácido e enzimáticos de bagaço de mandioca, com a bactéria *Xanthomonas campestris,* para a produção de goma xantana, mostram que após

96 horas de fermentação, a produção de goma xantana foi similar para ambos os casos, 10,8 g/L para o hidrolisado ácido e 11,48 g/L para o hidrolisado enzimático.

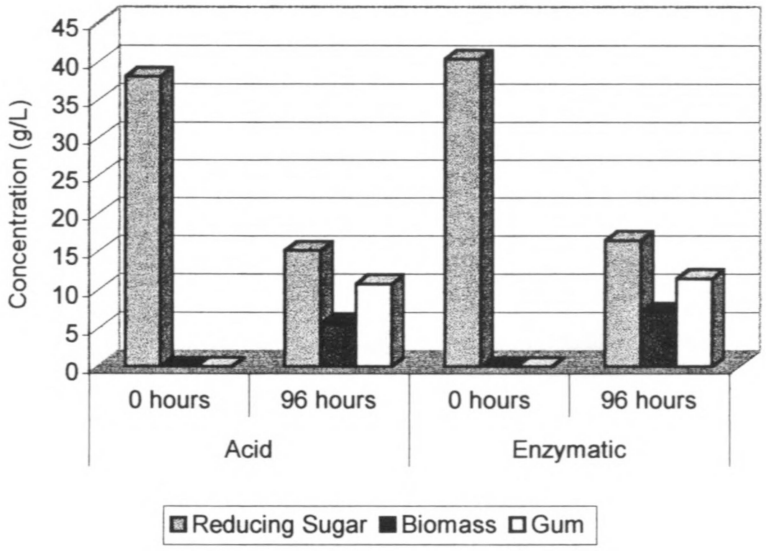


FIGURA 42. Comparação entre os hidrolisados ácido e enzimático de bagaço de mandioca, com relação à sua influência no consumo de açúcar redutor e produção de biomassa e de goma xantana.

A produção de biomassa ligeiramente maior para a fermentação com o hidrolisado enzimático, 7,13 g/L, e 5,6 g/ com o hidrolisado ácido. O consumo de glicose foi semelhante para ambos os casos, restando ainda muito açúcar no meio de fementação.

A concentração inicial de açúcar redutor em torno de 40 g/L foi tentada com o objetivo de verificar se produções maiores de goma xantana poderiam ser obtidas com o hidrolisado enzimático, já que a concentração salina no meio é menor neste caso, e teoricamente esta poderia ser uma condição favorável ao processo, entretanto, não foi verificada na fermentação nenhum benefício do hidrolisado enzimático em relação ao hidrolisado ácido de bagaço de mandioca.

Em função destes resultados, para os próximos ensaios de fermentação realizados com a bactéria *Xanthomonas campestris,* com o objetivo de produzir a goma xantana, serão utilizados os hidrolisados de casca de café e de bagaço de mandioca produzidos nas condições de hidrólise otimizadas nos itens 4.2 e 4.3.

4.8 Fermentações com o hidrolisado de casca de café

4.8.1 Fermentação sem suplementação com fonte de nitrogênio

No primeiro experimento, foi utilizado o hidrolisado de casca de café produzido nas condições otimizadas de hidrólise conforme item 4.2. Não foi utilizada suplementação com fonte de nitrogênio específica, com a finalidade de verificar se a bactéria *Xanthomonas campestris* era capaz de utilizar o nitrogênio presente na cafeína ou o nitrogênio protéico da casca de café. Após 96 horas de fermentação, não foi verificado crescimento bacteriano no meio de cultivo, indicando que o microrganismo em questão não é capaz de degradar cafeína ou utilizar o nitrogênio protéico da casca de café.

4.8.2 Fermentação do hidrolisado de casca de café suplementado com extrato de levedura

O ensaio de fermentação com o hidrolisado de casca de café suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio e sal de potássio conforme indicado no item 3.2, foi feito por um período de 96 horas, com amostragens a cada 24 horas. As fermentações foram realizadas em duplicata.

O resultado das análises de Açúcar Redutor no hidrolisado, biomassa e goma produzida estão no gráfico da figura 43.

O gráfico da figura 43 mostra que houve crescimento microbiano, caracterizando que, os produtos tóxicos, cafeína e taninos, presente no hidrolisado, não inibem o metabolismo da bactéria utilizada.

A produção de goma xantana foi evidenciada pelo aumento de viscosidade no meio. O aumento da viscosidade no meio não medida, mas foi observada.

A quantidade de goma produzida não pode ser precisada porque o método de precipitação da goma solúvel consiste em precipita-la com 2-2,5 volumes de etanol.

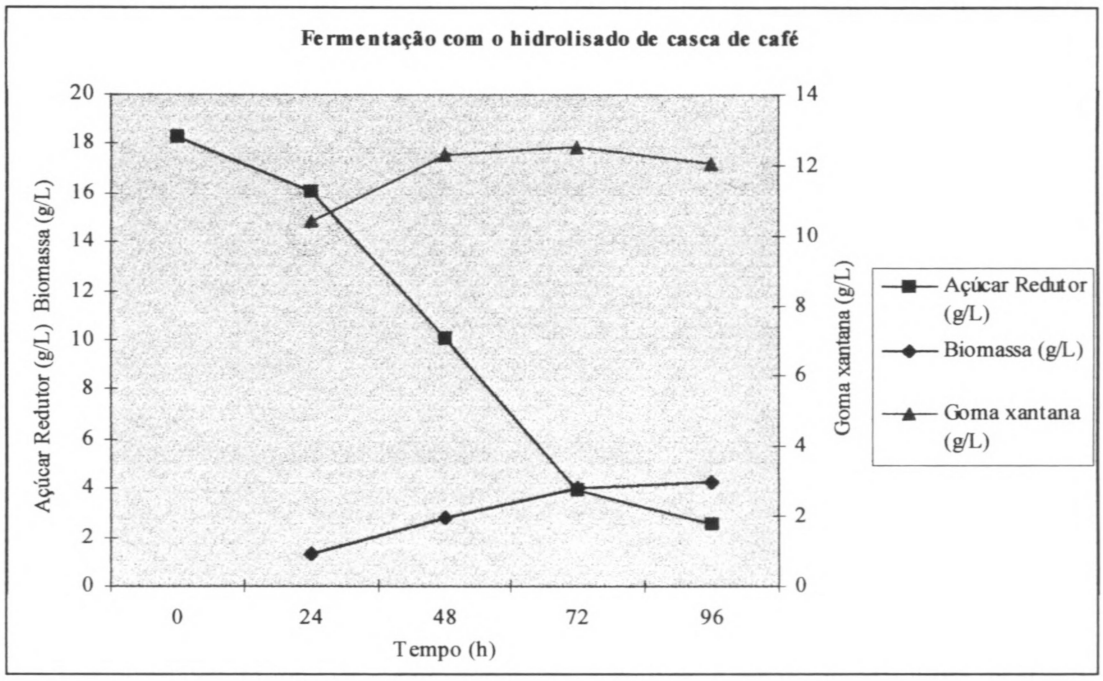


FIGURA 43. Resultado da fermentação com o hidrolisado de casca de café suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

No meio alcoólico ocorre também a precipitação de antocianinas, compostos que conferem ao hidrolisado de casca de café a sua coloração típica. Assim estas antocianinas precipitam junto com a goma xantana. Quando este material é recuperado apresenta uma coloração escura.

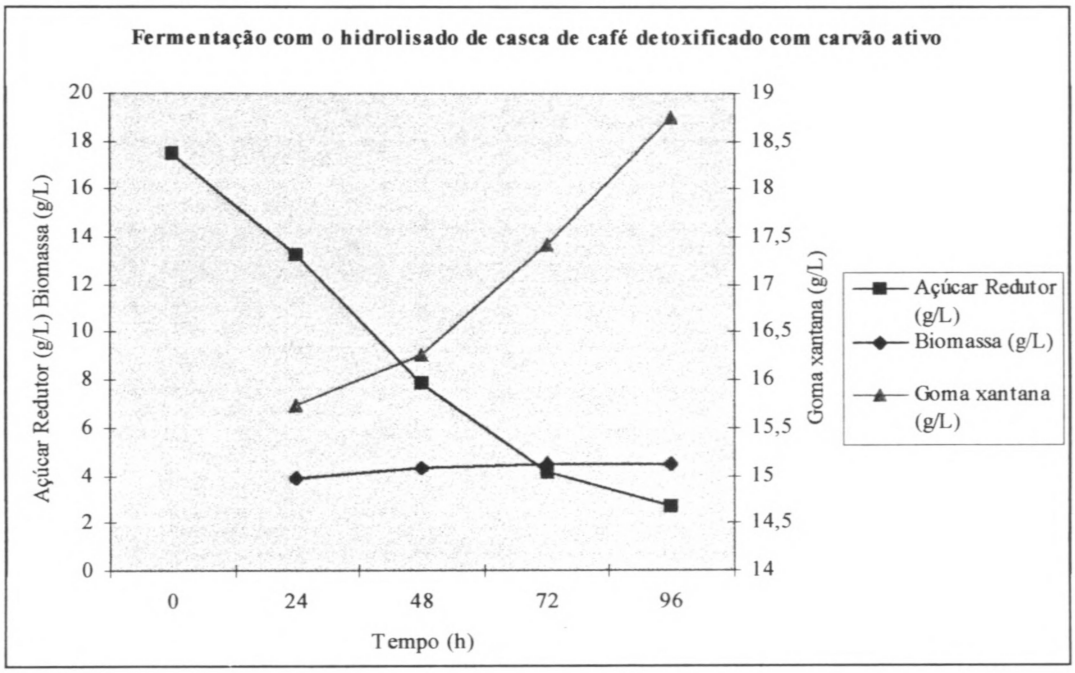
A goma xantana produzida com o hidrolisado de casca de café, apesar de se apresentar com impurezas pode ser aproveitada, mas tem sua utilização limitada a usos menos nobres.

A precipitação destes compostos que conferem cor escura ao hidrolisado, e que estão presentes no hidrolisado de casca de café foi feita, e mostrou que o hidrolisado utilizado na fermentação anterior apresentou a 14,8 g/L de material precipitado com 2 volumes de etanol.

4.8.3 Fermentação do hidrolisado de casca de café suplementado com extrato de levedura após detoxificação com carvão ativo

Com o objetivo de melhorar as características do hidrolisado de casca de café com vistas à obtenção de uma goma xantana mais pura, foi feita a detoxificação do mesmo com carvão ativo, e após foi realizada a fermentação. Foram realizadas análises de cafeína e taninos antes e depois da detoxificação.

A fermentação foi feita por 96 horas com coletas de amostras para análise de 24 em 24 horas. O resultado das análises de Açúcar Redutor no hidrolisado, biomassa e goma produzida estão no gráfico da figura 44.



FIGUR 44. Resultado da fermentação com o hidrolisado de casca de café suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio após detoxificação com carvão ativo.

Os resultados das análises de cafeína e taninos realizadas no hidrolisado de casca de café antes e depois do processo de detoxificação estão apresentados na tabela 18.

TABELA 18. Resultados das análises de cafeína e taninos nos hidrolisados de casca de café com e sem detoxificação com carvão ativo.

Amostra	Cafeína (mg/100 mL)	Taninos (g/L)
Hidrolisado sem detoxif.	72,6	1,379
Hidrolisado detoxificado	6,34	0,711

Dos dados apresentados na figura 44. e na tabela 18, conclui-se que o processo de detoxificação do hidrolisado de casca de café levou a uma diminuição do teor de cafeína e taninos no meio. Esta diminuição de compostos tóxicos em solução permitiu um crescimento mais rápido do microrganismo usado no processo fermentativo. 3,85 g/L de biomassa com 24 horas de fermentação no processo com o hidrolisado de café detoxificado com carvão ativo, contra 1,79 g/L de biomassa no mesmo período com o hidrolisado sem detoxificação.

Embora a adaptação do microrganismo ao meio tenha sido melhor quando o hidrolisado foi detoxificado, a biomassa produzida no final da fermentação não apresentou diferença significativa. 4,24 g/L para a fermentação com o hidrolisado sem detoxificação com carvão ativo, contra 4,46 g/L para a fermentação com o hidrolisado detoxificado.

Não houve diferença também quanto à qualidade da goma produzida. Isso porque, o tratamento com carvão ativo não promoveu uma remoção importante de coloração no hidrolisado.

A goma precipitada ainda se apresentava de cor escura, mostrando que compostos presentes no hidrolisado precipitam junto com a goma. Outra confirmação disso é o fato de que a quantidade de material precipitado, 18,74 g/L, é maior do que a quantidade de açúcar redutor presente no hidrolisado de casca de café, 17,505 g/L, no início da fermentação.

4.8.4 Fermentação do hidrolisado de casca de café sem detoxificação, misturado com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com extrato de levedura

Com o objetivo de produzir uma goma xantana mais pura, o que possibilitaria usos mais nobres para o produto, procedeu-se a uma adição de quantidades variáveis de hidrolisado de bagaço de mandioca ao hidrolisado de café.

Como o hidrolisado de casca de café tinha uma concentração de açúcar redutor de 25,44 g/L e o hidrolisado de bagaço de mandioca uma concentração de 56,91 g/L, procedeu-se a uma diluição do hidrolisado de bagaço de mandioca, com a finalidade de igualar a concentração de açúcar redutor nos hidrolisados.

A seguir os hidrolisados foram misturados nas proporções mostradas na tabela 8, e foram realizadas as fermentações por 96 horas com amostragens em 24, 48 e 96 horas. Os resultados estão apresentados na tabela. 19.

TABELA 19. Resultados da fermentação com as misturas de hidrolisado de casca de café e de bagaço de mandioca.

hidrol. de casca de café		0%	25%	50%	75%	100%
hidrol. de bagaço de mandioca		100%	75%	50%	25%	0%
Análise	Tempo (h)					
Açúcar Redutor (g/L)	0	25,44	26,82	26,72	26,64	25,34
	24	22,14	22,01	23,84	24,82	25,35
	48	13,14	14,92	16,25	18,58	18,94
	96	4,99	6,34	5,92	6,88	6,54
Biomassa (g/L)	0	0	0	0	0	0
	24	4,36	3,51	3,38	2,31	1,74
	48	4,73	4,52	4,18	4,32	2,91
	96	6,05	5,86	5,89	5,28	4,16
Goma Xantana (g/L)	0	0	0	0	0	0
	24	4,85	7,91	11,67	18,58	21,88
	48	7,73	11,94	17,30	19,20	21,78
	96	9,8	14,88	18,98	20,26	25,81

O material precipitado com 2,5 volumes de etanol nos fermentados obtidos neste teste está mostrado na figura 45.

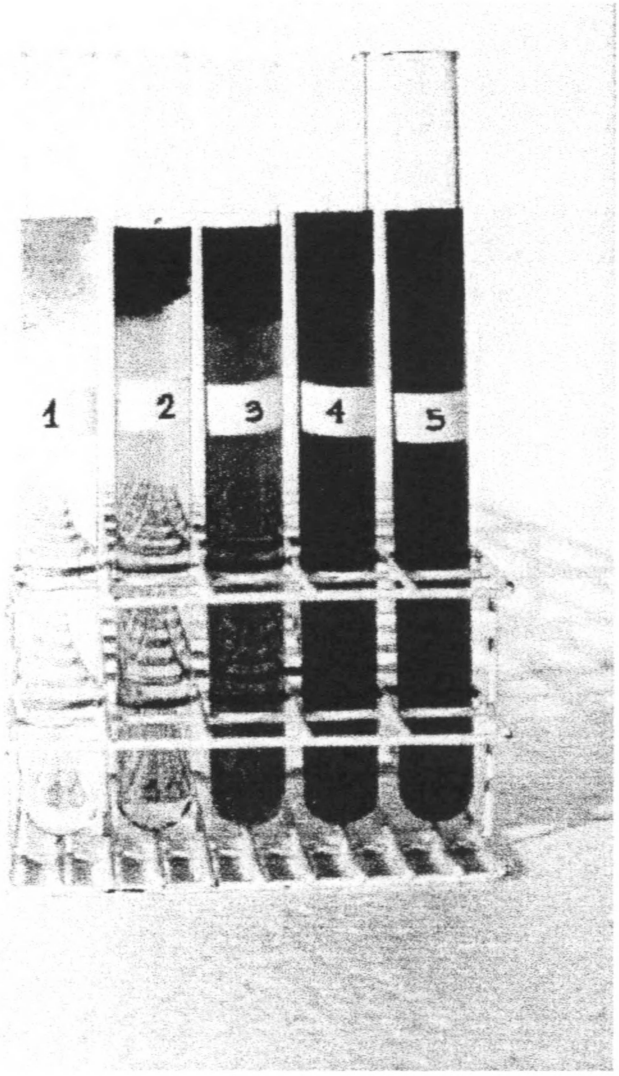


FIGURA 45. Goma xantana produzida na fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca, misturado com o hidrolisado de casca de café. (1) 100% de hidrolisado de bagaço de mandioca, (2) 75% de hidrolisado de bagaço de mandioca, (3) 50 % de hidrolisado de bagaço de mandioca, (4) 25 % de hidrolisado de bagaço de mandioca, (5) 100% de hidrol. de casca de café.

Observa-se que, com o aumento na proporção de hidrolisado de casca de café nas misturas, houve uma diminuição na biomassa produzida e um aumento na concentração de açúcar redutor residual nos fermentados medida ao longo da fermentação.

Quanto à goma produzida, observou-se que o material precipitado na extração da goma com etanol, apresentava coloração cada vez mais escura com o aumento da proporção de hidrolisado de casca de café na mistura, mostrando que mesmo em pequena concentração, com o hidrolisado de casca de café, a goma recuperada do caldo fermentativo, não é pura.

4.9 Fermentação do hidrolisado ácido de bagaço de mandioca

Como o objetivo do trabalho era desenvolver um processo de produção de goma xantana com substrato alternativo, barato e valorizando os recursos agroindustriais disponíveis, além de produzir um produto com alto grau de pureza e comercialmente competitivo, para os estudos seguintes, foi utilizado o hidrolisado de bagaço de mandioca.

4.9.1 Otimização da concentração de açúcar redutor no hidrolisado com fontes alternativas de nitrogênio.

O hidrolisado ácido de bagaço de mandioca preparado com 100 g/L de bagaço, produz um hidrolisado com concentração de açúcar redutor da ordem de 55-60 g/L. Mas devido ao aumento da viscosidade do meio causada pela produção de goma xantana, os processos de transferência de oxigênio e homogeneização do meio ficam sensivelmente prejudicados com o transcurso da fermentação. Isto reflete em uma diminuição da eficiência de produção de goma xantana no final da fermentação mesmo tendo ainda fonte de carbono no meio. Assim, e com base no experimento anterior, onde o teor de açúcar redutor residual no fermentado foi relativamente alto em todas as porcentagens de mistura dos hidrolisados de casca de café e de bagaço de mandioca, conclui-se que um fator importante no processo é a concentração de açúcar redutor no início da fermentação, pois alto teor de açúcar não corresponde a uma alta produção de goma xantana, e acarreta um desperdício de matéria prima, já que essa quantidade adicional de açúcar redutor presente no meio, será descartada.

Para otimizar a concentração inicial de açúcar redutor no substrato, foram testadas várias concentrações de açúcar redutor, em fermentações de 96 horas. Os resultados estão expressos nos gráficos das figuras 46, 47, 48 e 49, onde são mostradas as concentrações de açúcar redutor no início e no final da fermentação, bem como a goma xantana produzida em cada caso.

Observa-se nos dados da figura 46, que a concentração de açúcar redutor residual no caldo de fermentação após 96 horas é muito alta, acima de 20 g/L independente da fonte de nitrogênio utilizada, mostrando que o açúcar não foi metabolizado. Isto ocorreu, provavelmente por limitações físicas do sistema de fermentação submersa, que limitas as trocas gasosas e a homogeneização do sistema pelo aumento de viscosidade do meio.

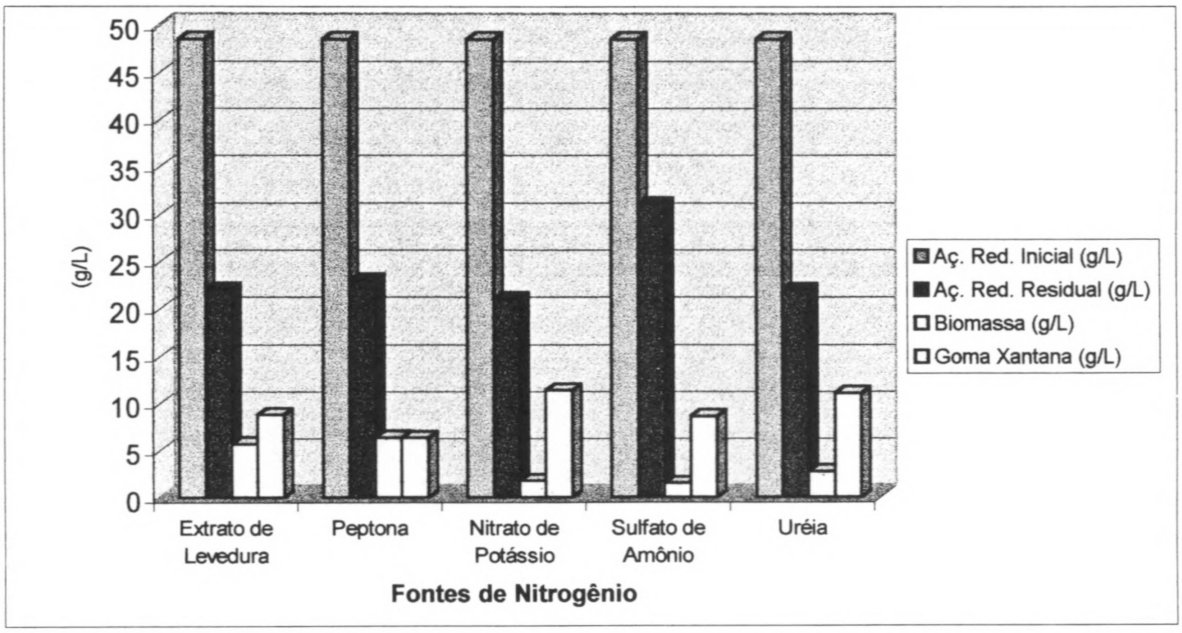


FIGURA 46. Fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 48,56 g/L, utilizando a *Xanthomonas campestris*, para produção de goma xantana.

As fermentações nas quais foram utilizados, extrato de levedura, peptona, nitrato de potássio e uréia apresentaram desempenhos semelhantes quanto ao consumo de açúcar, e apenas o sulfato de amônio mostrou ser a fonte de nitrogênio menos favorável ao processo.

A produção de biomassa foi semelhante para os testes onde foram utilizados o extrato de levedura e a peptona, e menores com nitrato de potássio, sulfato de amônio e uréia. A produção de goma xantana foi melhor com a utilização de nitrato de potássio e uréia, e a menor produção foi com a utilização de peptona como fonte de nitrogênio.

Diminuindo-se a concentração inicial de açúcar redutor nos hidrolisados da ordem de grandeza de 50 para 40 g/L, dados mostrados na figura 47, verifica-se que ainda permanece uma grande quantidade de açúcar redutor residual no caldo fermentado ao final da fermentação. No entanto o comportamento quanto à produção de biomassa, semelhante para extrato de levedura e peptona, e menores para nitrato de potássio, sulfato de amônio e uréia, permanece conforme a fermentação com concentração inicial de açúcar redutor de 48,56 g/L.

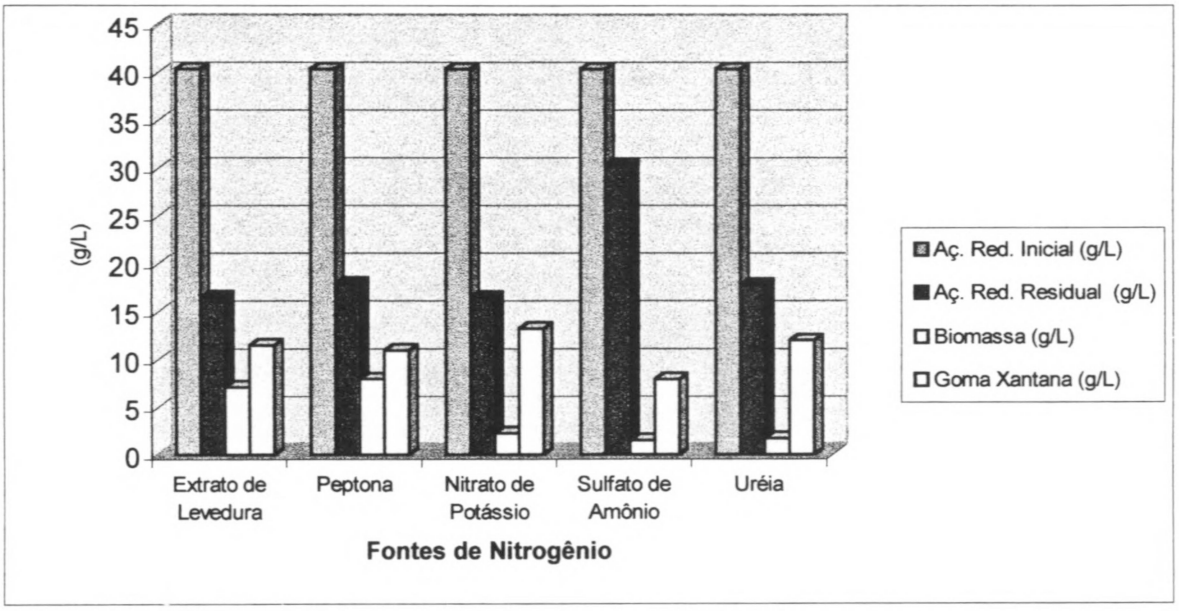


FIGURA 47. Fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 40,36 g/L, utilizando a *Xanthomonas campestris*, para produção de goma xantana.

A produção de goma xantana também apresentou um comportamento semelhante com a fermentação anterior, com melhor rendimento de produção quando foi utilizado o nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.

Com concentração inicial de açúcar redutor de 24,42 g/L, dados mostrados na figura 48, o comportamento quanto à produção de biomassa e de goma xantana repete o que já foi observado anteriormente. Quanto à concentração de açúcar redutor residual no caldo fermentado, ainda verifica-se um residual em torno de 20% nas fermentações com extrato de levedura, peptona, nitrato de potássio e uréia, que não foi utilizado no processo. Com sulfato de amônio o consumo de açúcar redutor do hidrolisado foi menor do que com as outras fontes de nitrogênio testadas, assim como a produção de biomassa e de goma xantana.

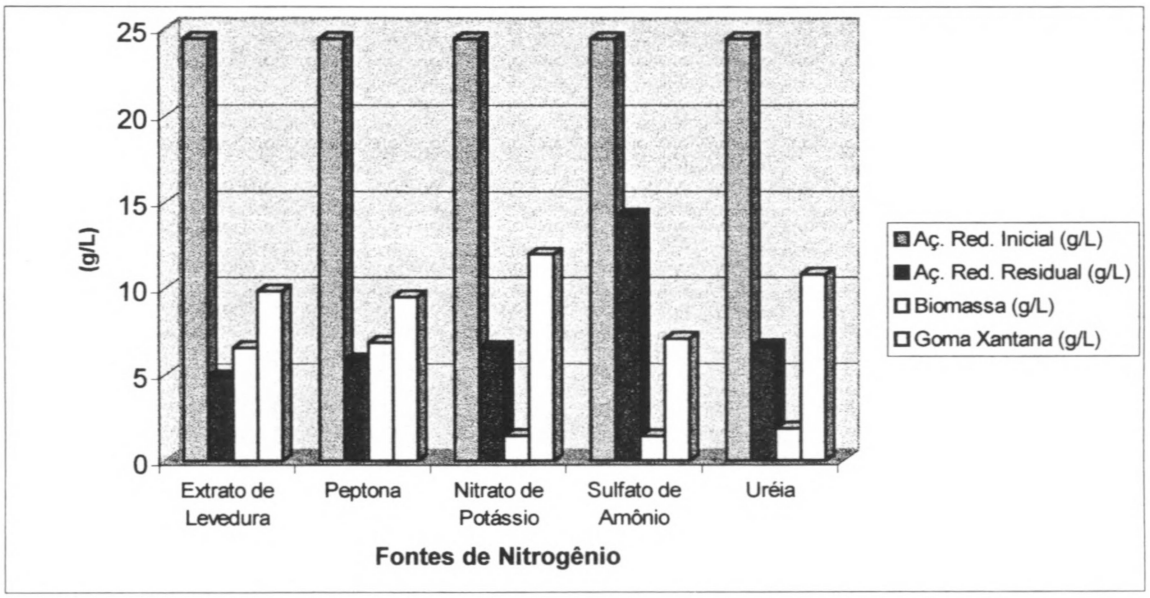


FIGURA 48. Fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 24,42 g/L, utilizando a *Xanthomonas campestris*, para produção de goma xantana.

O teste de fermentação com 19,82 g/L de açúcar redutor, dados mostrados na figura 49, confirma todas as produções de goma xantana obtidas nas fermentações com concentração de açúcar redutor de 48,56 g/L, 40,36 g/L e 24,42 g/L. Extrato de levedura, peptona, nitrato de potássio e uréia, são fontes de nitrogênio equivalentes, com relação ao consumo de açúcar. Observa-se que com estas fontes de carbono, o consumo de açúcar redutor foi em torno de 90%.

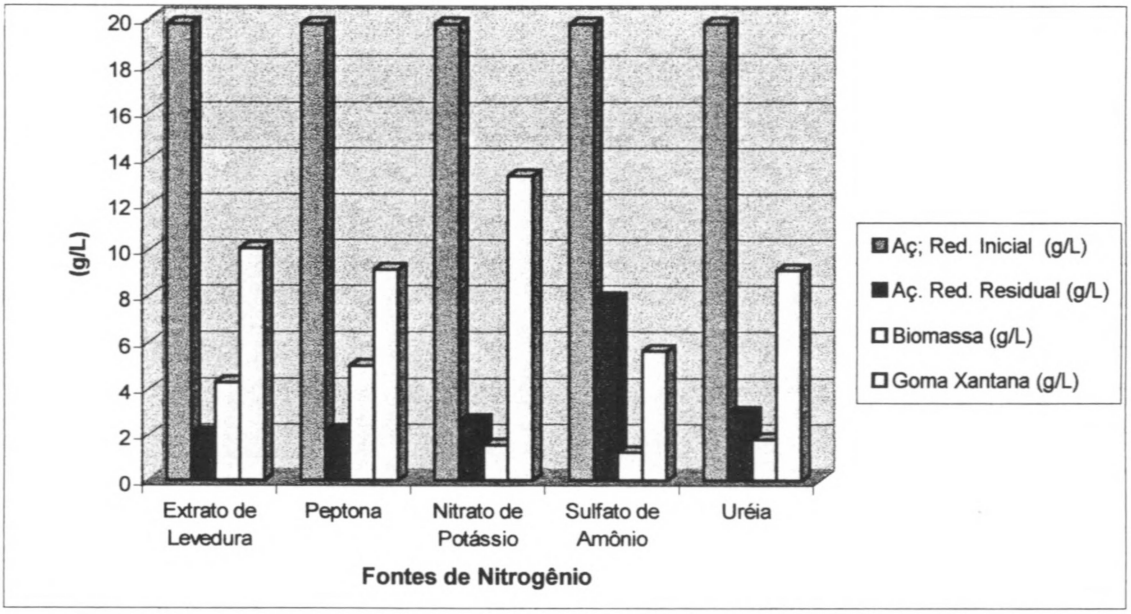


FIGURA 49. Fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 19,82 g/L, utilizando a *Xanthomonas campestris*, para produção de goma xantana.

Com relação à biomassa observa-se neste ensaio de fermentação, o mesmo comportamento observado nas fermentações com concentração maior de açúcar redutor inicial: com extrato de levedura e peptona, a produção de biomassa foi maior do que com nitrato de potássio, sulfato de amônio e uréia. Quanto à produção de goma xantana em todos os casos o melhor rendimento foi obtido com nitrato de potássio.

Destes testes conclui-se que a melhor concentração de açúcar redutor no início do processo é em torno de 20 g/L. Estes dados confirmam os valores definidos por LAWRENCE, 1976, que desenvolveu, sugeriu e patenteou modificações no meio de fermentação para a produção de goma xantana, com a *Xanthomonas campestris.* A concentração de glicose no meio, quando utilizada como única fonte de carbono, estava sempre em torno de 2,0 a 2,5%.

Como fonte de nitrogênio, o melhor produto, entre as opções testadas foi o nitrato de potássio. LAWRENCE, 1976, testou também fontes alternativas de nitrogênio, orgânicas e inorgânicas, e patenteou meios de fermentação, para a produção de goma xantana, com nitrato de amônio, peptona de soja e

hidrolisados protéicos à base de soja, obtendo com estes meios, bons rendimentos de produção de goma xantana.

LAWRENCE, 1976, também relata a patente de um meio alternativo, o qual a fonte de carbono é farinha de arroz.

Todos estes meios patenteados por LAWRENCE, 1976, são complementados com fosfato ácido dipotássico, sulfato de magnésio hepta hidratado e uma ou mais fontes de nitrogênio. No caso da peptona de soja e dos hidrolisados enzimáticos de farinha de soja, estes são utilizados também como fonte de carbono, apenas complementada com dextrose.

4.9.2 Cinéticas do processo fermentativo

Com o objetivo de conhecer o comportamento da fermentação ao longo do tempo, e definir o tempo ideal de fermentação, foram realizadas cinéticas dos processos fermentativos com o hidrolisado de bagaço de mandioca, complementado com as várias fontes de nitrogênio testadas. A concentração inicial de açúcar redutor foi definida em torno de 20 g/L.

Os dados das cinéticas realizadas estão mostrados nos gráficos das figuras 50, 51, 52, 53 e 54.

Observa-se na figura 50, que apresenta os dados da fermentação realizada com extrato de levedura como fonte de nitrogênio, que o consumo do açúcar redutor presente no hidrolisado no início do processo foi alto. O residual de açúcar redutor no final da fermentação foi de 1,59 g/L.

A biomassa produzida atingiu 6,29 g/L , com tempo de fermentação de 60 horas, permaneceu neste patamar até 72 horas, decrescendo até 4,14 com 96 horas de fermentação, caracterizando a fase de declínio da cultura.

A produção de goma xantana com 84 horas de fermentação foi de 9,77 g/L passando para 9,98 g/L com 96 horas de fermentação, ou seja um ganho muito pequeno nas 8 horas finais de fermentação. Isso confirma o tempo de fermentação dado em literatura.

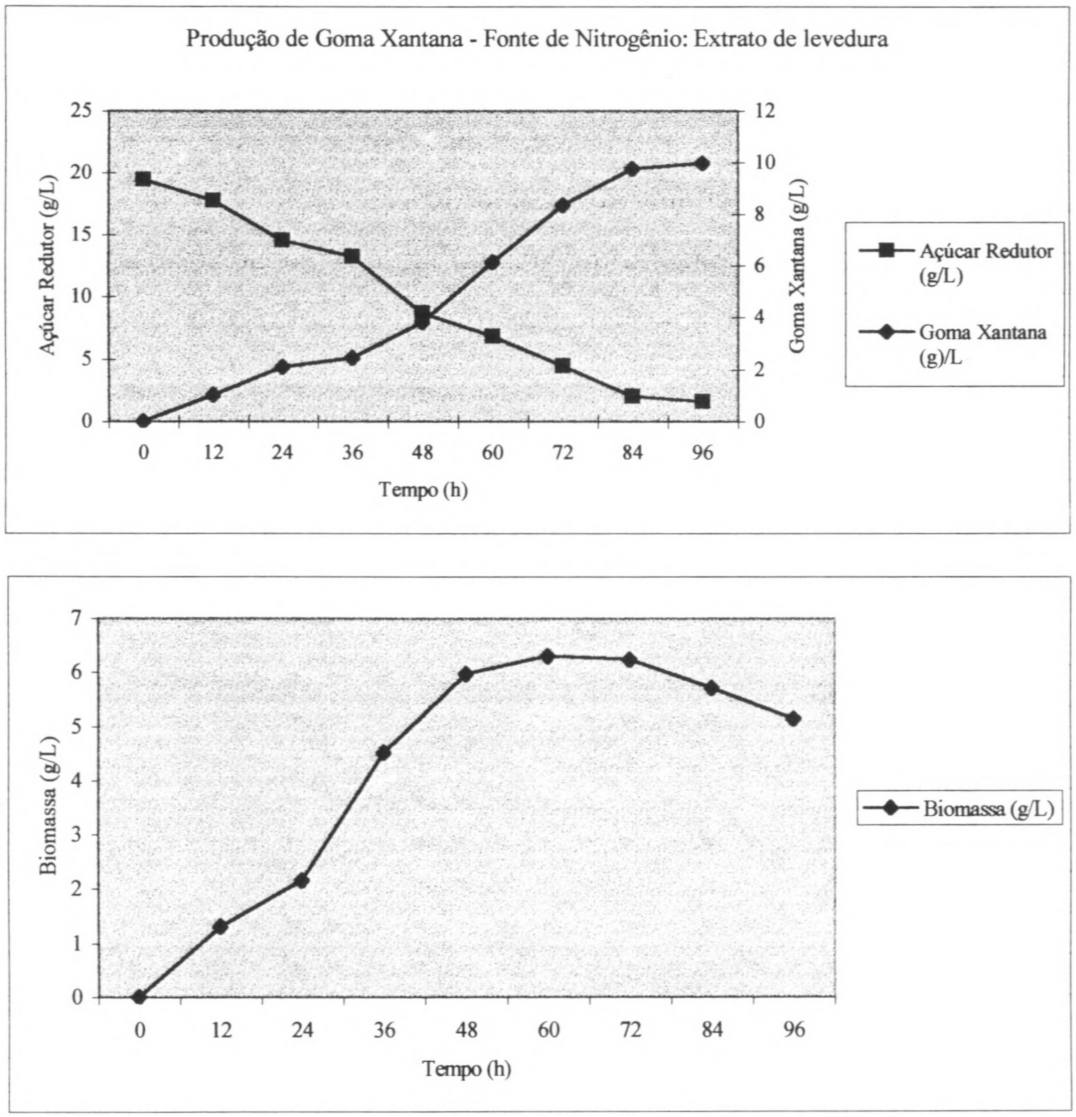


FIGURA 50. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 19,45 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

De acordo com ATKINSON & MAVITUNA, 1991, processos industriais de produção de goma xantana tem período médio de fermentação de 80 horas. LAWRENCE, 1973, utilizou tempos em torno de 72 horas, para as fermentações com os meios desenvolvidos e patenteados por ele.

Na cinética da fermentação utilizando peptona como fonte de nitrogênio, mostrada na figura 51, o teor de açúcar redutor no início do processo foi de 18,77 g/L, e no final foi de 1,66 g/L, menos de 10% do valor inicial, caracterizando um bom consumo de açúcar.

A biomassa, da mesma forma que na fermentação com extrato de levedura atingiu o valor máximo de 5,15 g/L com 60 horas de fermentação, permanecendo mais ou menos constante até 84 horas, onde foi determinado o valor de 5,05 g/L, decrescendo nas oito horas finais de fermentação, caracterizando também aqui, a fase de declínio da cultura.

A produção de goma xantana chegou a 9,31 g/L com 60 horas de fermentação, chegando a 9,7 com 84 horas de fermentação e 9,58 g/L com 96 horas de fermentação. O aumento na produção de goma xantana foi pequeno no intervalo de 60 a 84 horas, e a partir daí pode ser considerado constante.

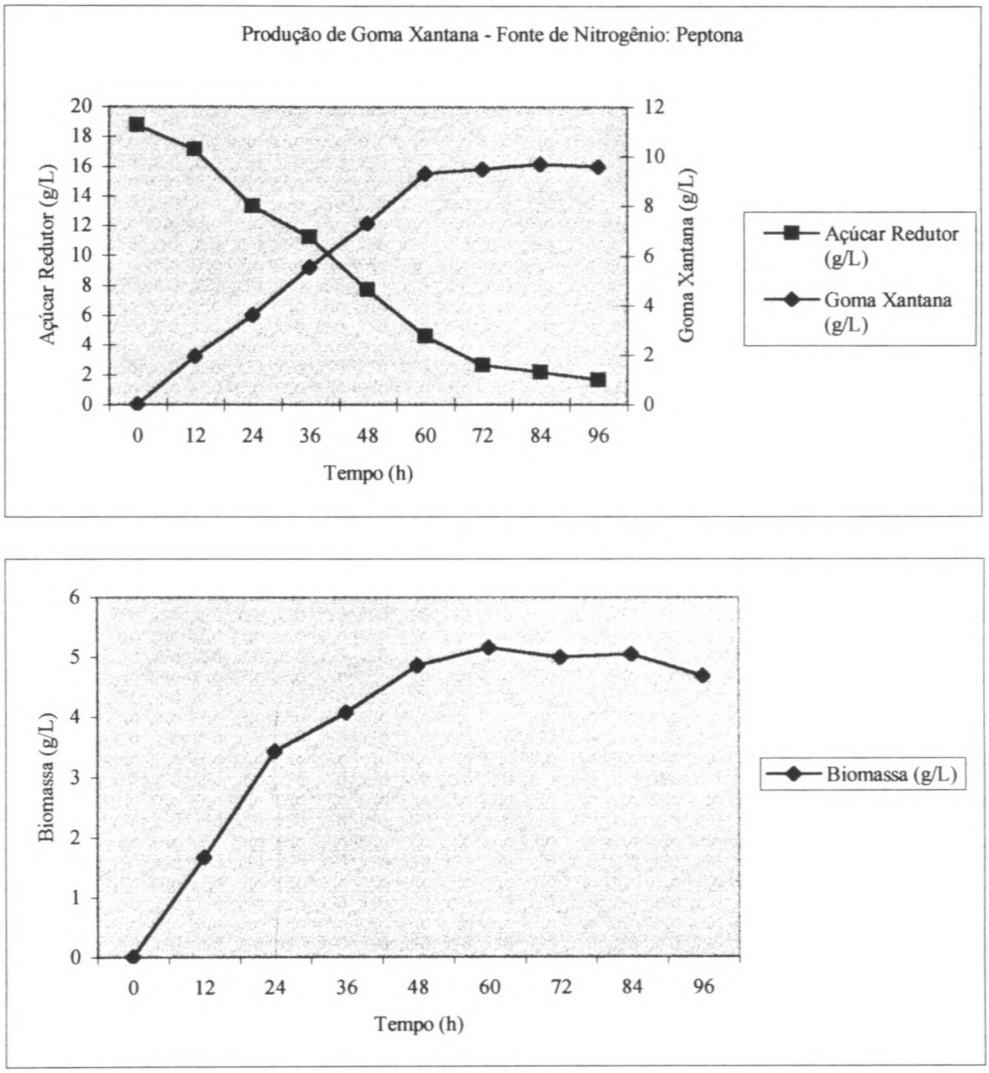


FIGURA 51. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 18,77 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, e peptona como fonte de nitrogênio.

Na cinética da fermentação onde foi utilizando o nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, mostrada na figura 52, o açúcar redutor no início do processo foi de 19,54 g/L e no final 1,18 g/L, pouco mais de 6% do valor inicial, caracterizando ótimo consumo de açúcar. A biomassa produzida foi baixa, permanecendo entre 1,67 e 1,81 g/L no intervalo entre 48 e 96 horas. Isto mostra que o microrganismo em questão utiliza o nitrato, nitrogênio inorgânico, como fonte de nitrogênio, mas a conversão para biomassa é difícil. A produção de goma xantana atingiu o valor máximo com 84 horas de fermentação, 14,03 g/L. Este dado também está de acordo com ATKINSON & MAVITUNA, 1991.

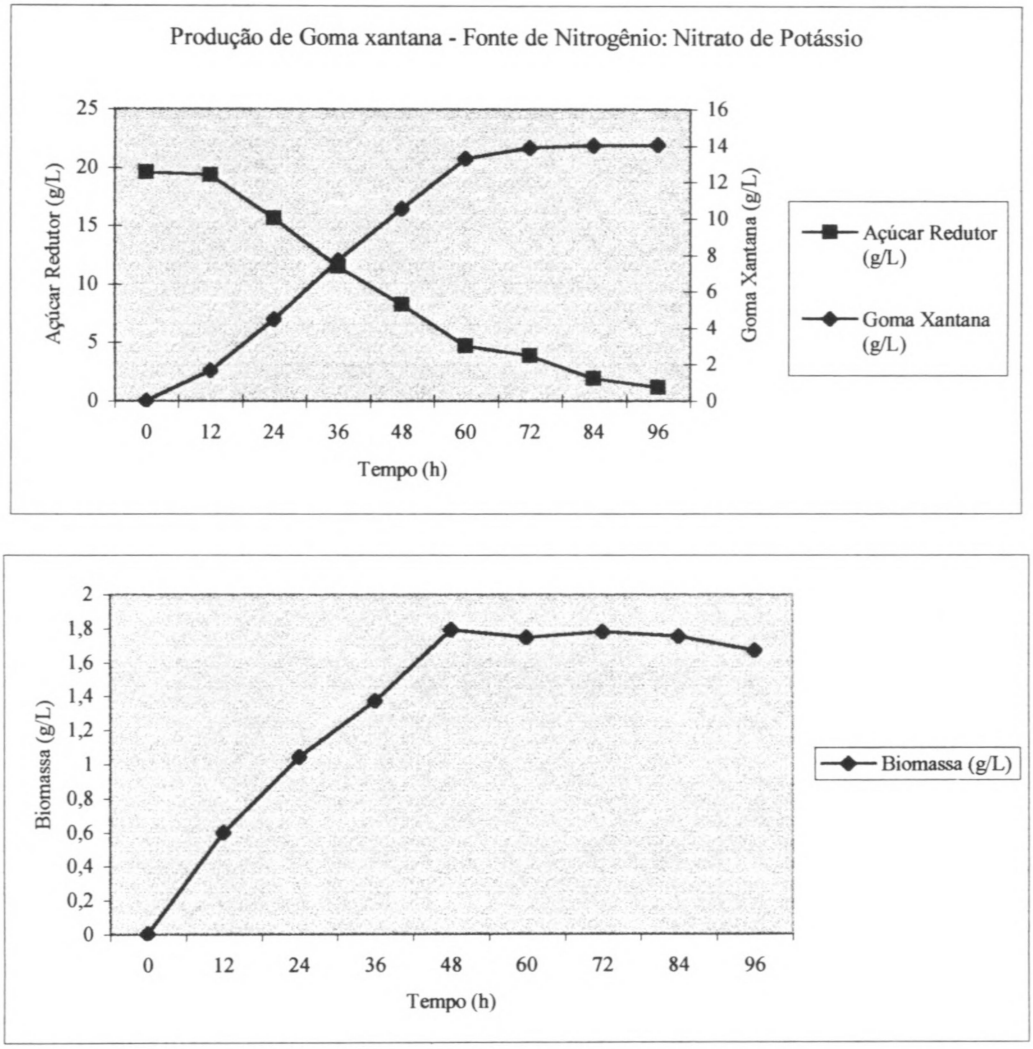


FIGURA 52. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 19,54 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, e nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.

A cinética da fermentação com sulfato de amônio mostrada na figura 53, apresentou a menor taxa de utilização do substrato de todas as cinéticas realizadas. No início da fermentação o teor de açúcar redutor foi de 21,05 g/L e no final havia ainda 5,82 g/L de açúcar não utilizado pelo microrganismo, 27,65% do teor de açúcar redutor inicial. A produção de biomassa foi pequena, permanecendo entre 1,59 e 1,47 entre os tempos 48 e 84 horas.

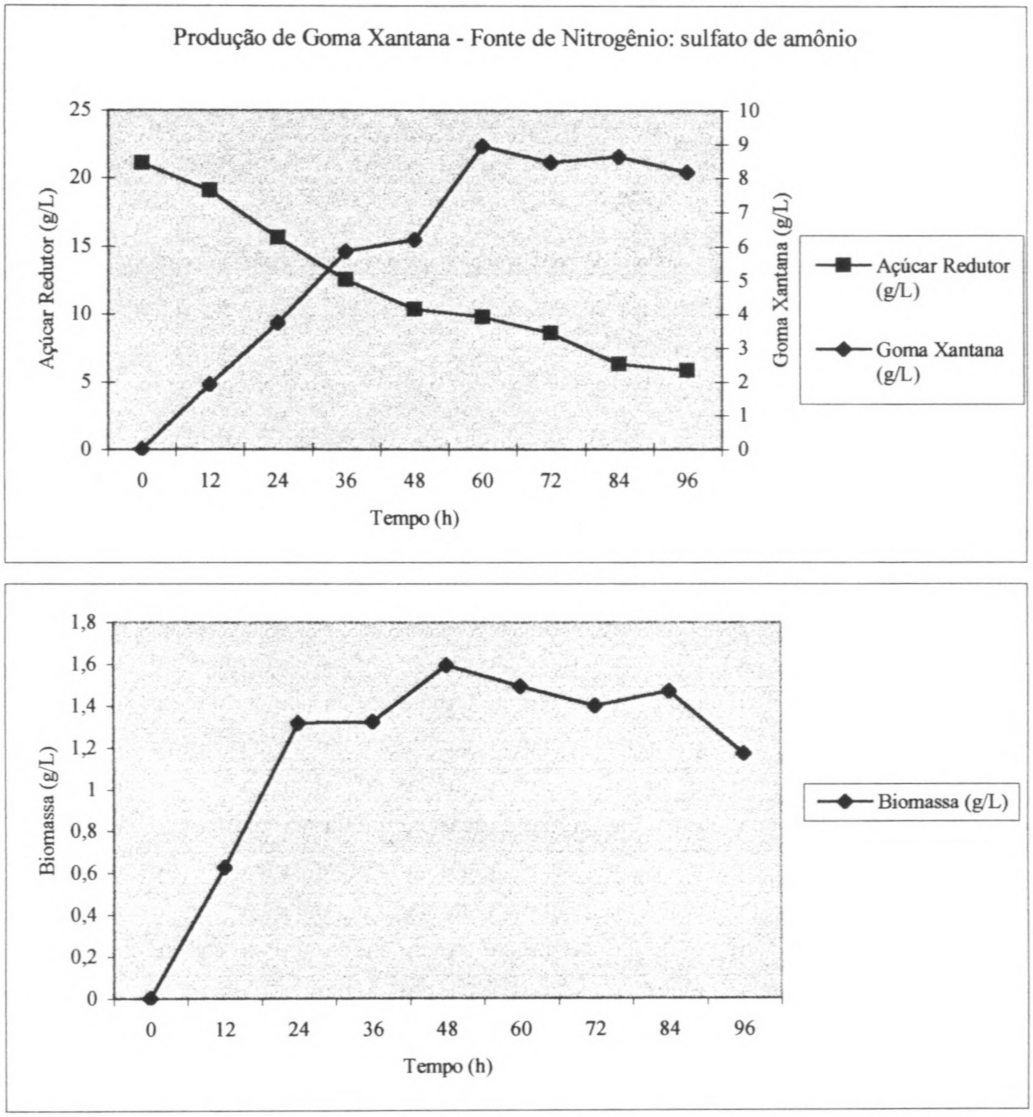


FIGURA 53. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 21,05 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

A produção de goma xantana chegou a 8,94 g/L com tempo de 60 horas de fermentação, apresentando valores entre 8,0 e 9,0 nos tempos seguintes.

Os baixos valores de biomassa confirmam que, da mesma forma que na fermentação com nitrato de potássio, há um alto grau de dificuldade para converter o nitrogênio inorgânico em biomassa. Com o sulfato, o meio se torna ainda mais desfavorável, inclusive para o metabolismo do açúcar, já que o residual de açúcar no meio foi o maior de todas as fermentações com as várias fontes de nitrogênio testadas. Isto provavelmente é devido ao aumento da salinidade do meio provocada pelo sal utilizado como fonte de nitrogênio, o sulfato de amônio.

Na fermentação utilizando-se uréia como fonte de nitrogênio, cinética mostrada na figura 54, partiu-se de 18,77 g/L de açúcar redutor, chegando ao final da fermentação com 2,09 g/L.

Utilizando-se uréia como fonte de nitrogênio, a biomassa produzida também foi pequena, entre 2,37 e 2,51 entre 48 e 96 horas de fermentação. Isto mostra que a utilização do nitrogênio da uréia para a produção de biomassa também é difícil para a bactéria utilizada neste processo. A produção de goma xantana atingiu o máximo com 72 horas de fermentação, permanecendo mais ou menos constante nos tempos 84 e 96 horas.

As cinéticas feitas confirmam que o processo de produção de goma xantana é viável tecnicamente com fontes inorgânicas de nitrogênio. Relativamente boa quando se utilizou a uréia, não muito eficiente quando se utilizou sal de amônio, no caso sulfato de amônio, mas bastante eficiente quando se utilizou o nitrato de potássio.

Fontes orgânicas e ricas de nitrogênio, como o extrato de levedura e a peptona, também se mostraram eficientes, mas sendo meios ricos e preparados, são mais caros que os sais inorgânicos usados.

Os tempos de fermentação confirmam os dados de literatura, que definem 80 horas de fermentação em processos industriais. (ATKINSON & MAVITUNA, 1991).

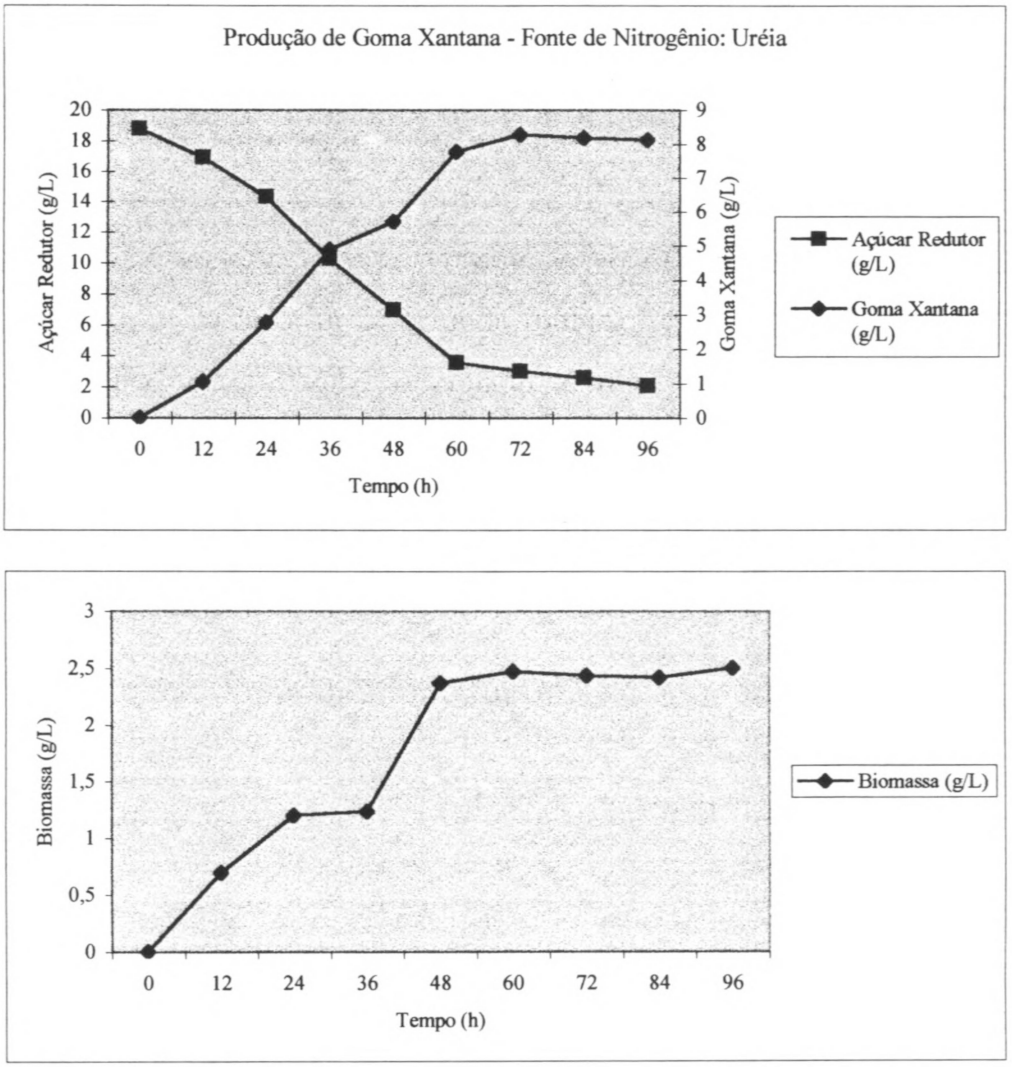


FIGURA 54. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 18,77 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, e uréia como fonte de nitrogênio.

4.9.3 Determinação dos parâmetros cinéticos dos processos fermentativos

Com o objetivo de avaliar os processos testados, foram calculadas para as cinéticas realizadas, as velocidades médias de consumo de substrato, produção de biomassa e produção de goma xantana, assim como os fatores de conversão de substrato em produto e em biomassa.

Os dados obtidos estão apresentados na tabela 20.

TABELA 20. Parâmetros inicial e final, com os fatores de conversão de substrato em biomassa e em goma xantana, calculados a partir dos dados levantados na cinética da fermentação com a *Xanthomonas campestris* do hidrolisado de bagaço de mandioca com as várias fontes de nitrogênio testadas.

	Fontes de nitrogênio				
	extrato de levedura	peptona	nitrato de potássio	sulfato de amônio	uréia
Aç. redutor Inicial (g/L)	19,45	18,77	19,54	21,05	18,77
Aç. redutor final (g/L)	1,59	1,66	1,18	5,82	2,09
Aç. redutor consumido (g/L)	17,86	17,11	18,36	15,23	16,68
Máxima biomassa produzida (g/L)	6,24	5,15	1,81	1,59	2,51
Fator de conversão substrato em biomassa ($Y_{X/S}$)	0,3494	0,3009	0,0986	0,1044	0,1505
Goma xantana máxima produzida (g/L)	9,98	9,70	14,03	8,94	8,28
Fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$)	0,5588	0,5669	0,7642	0,5870	0,4964
% de conversão substrato em produto	55,88	56,69	76,42	58,70	49,64

Os valores de açúcar redutor no final de cada fermentação mostram de maneira clara em que condições ocorrem os vários processos fermentativos. Açúcar redutor final alto indica que a fermentação ocorre em condições difíceis e instáveis, onde o microrganismo não consegue utilizar toda a fonte de carbono disponível.

Confirmando os dados obtidos nos testes realizados para se definir a melhor concentração inicial de açúcar redutor para o processo, das fontes de nitrogênio testadas, a menos favorável para o microorganismo em questão foi o sulfato de amônio. A fermentação onde foi utilizado o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, apresentou ao final de 96 horas, um teor de açúcar residual de 5,82 g/L, mais de 25% do açúcar redutor no tempo inicial.

Na fermentação onde foi utilizado o nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, o consumo de açúcar foi alto, restando ao final de 96 horas apenas 6% do açúcar presente no início da fermentação. Apesar de ser também uma fonte inorgânica de nitrogênio, foi bem assimilada pelo microrganismo, não para fins de síntese de biomassa, já que a produção de biomassa foi muito pequena, 1,81 g/L em relação à biomassa produzida com fontes orgânicas de nitrogênio (extrato de levedura, 6,24 g/L e peptona, 5,15 g/L). Assim , como a formação de biomassa foi controlada, maior quantidade de substrato foi direcionado para a síntese do produto desejado, a goma xantana.

A análise dos fatores de conversão calculados mostra que quanto menor for o fator de conversão de substrato em biomassa, melhor para o processo. Fatores de conversão de substrato em biomassa baixos indicam que mais substrato está disponível para ser convertido em produto.

A fermentação com nitrato de potássio produziu a melhor produção de goma xantana, 14,03 g/L, e a maior taxa de conversão de substrato em produto, 76,42 %.

A análise dos dados da tabela 20 mostra que a fermentação com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, forneceu o menor fator de conversão de substrato em biomassa, e o maior fator de conversão de substrato em produto, de todos as fontes de nitrogênio testadas. Na seqüência extrato de levedura e peptona foram as fontes de nitrogênio mais favoráveis ao processo, analisando-se o fator de conversão de substrato em produto, muito embora, apresentaram fator de conversão de substrato em biomassa altos.

Foram calculados também para as fermentações realizadas com as fontes alternativas de nitrogênio, os parâmetros cinéticos dos processos.

A tabela 21 mostra os valores dos parâmetros cinéticos calculados para os processos fermentativos realizados com as várias fontes de nitrogênio testadas

Para os cálculos de velocidade volumétrica de formação de produto e biomassa, foram considerados os valores máximos obtido nos testes de fermentação e os respectivos tempos onde estes valores foram atingidos. Para o cálculo da velocidade volumétrica de consumo de substrato, foram considerados os tempos totais e o consumo total de açúcar redutor.

TABELA 21. Parâmetros cinéticos das fermentações realizadas a *Xanthomonas campestris*, com o hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com fontes alternativas de nitrogênio.

	Fontes de nitrogênio				
	extrato de levedura	peptona	nitrato de potássio	sulfato de amônio	uréia
Goma xantana produzida (g/L)	9,98	9,70	14,03	8,94	8,28
Tempo (h)	96	84	84	60	72
Velocidade Volumétrica de formação de produto (g/L.h)	0,104	0,115	0,170	0,149	0,115
Máxima Biomassa Produzida (g/L)	6,24	5,15	1,81	1,59	2,51
Tempo (h)	60	60	48	48	96
Velocidade Volumétrica de formação de biomassa (g/L.h)	0,104	0,086	0,038	0,033	0,026
Substrato consumido em 96 horas (g/L)	17,86	17,11	18,36	15,23	16,68
Velocidade Volumétrica de consumo de substrato (g/L.h)	0,186	0,178	0,191	0,159	0,174

Observa-se que a produção de biomassa foi alta, quando fontes orgânicas de nitrogênio foram utilizadas. Com extrato de levedura e com peptona a biomassa produzida foi de 6,24 e 5,15 g/L respectivamente. Com fontes inorgânicas de nitrogênio a biomassa produzida foi menor, entre 1,59 e 2,51 g/L. Isto mostra que a bactéria assimila melhor fontes orgânicas de nitrogênio.

Este comportamento não é semelhante para a produção de goma xantana. Verifica-se que, o nitrato de potássio, é a fonte de nitrogênio que possibilitou a maior produção de goma xantana, por conseguinte levou à maior velocidade de formação de produto.

4.9.4 Determinação das velocidades específicas dos processos fermentativos

A tabela 22 apresenta as velocidades específicas de produção de goma xantana, de produção de biomassa e de consumo de substrato na fase de crescimento exponencial do processo de produção de goma xantana com as fontes de nitrogênio testadas.

A tabela 23 apresenta as velocidades específicas de formação de goma xantana, de produção de biomassa e de consumo de substrato na fase estacionária do crescimento microbiano, do processo de produção de goma xantana com as fontes de nitrogênio testadas.

As velocidades específicas de produção de biomassa, de formação do produto e de consumo de substrato são medidas com a finalidade de se avaliar o desempenho dos sistemas com diferentes valores de biomassa.

Observa-se das tabelas 22 e 23 que o processo fermentativo com fontes orgânicas de nitrogênio, extrato de levedura e peptona, apresentaram velocidades específicas de consumo de substrato menores quando comparadas com os dados das fermentações, onde foram usadas fontes inorgânicas de nitrogênio, nitrato de potássio, sulfato de amônio e uréia. O mesmo ocorre com as velocidades específicas de produção da goma xantana.

Isto acontece porque com as fontes orgânicas de nitrogênio, ricas em nutrientes, a produção de biomassa foi sempre maior do que com as fontes inorgânicas de nitrogênio.

TABELA 22. Velocidades específicas do processo de produção de goma xantana na fase exponencial de crescimento.

	Fontes de nitrogênio				
	extrato de levedura	peptona	nitrato de potássio	sulfato de amônio	uréia
Intervalo de crescimento exponencial	12 a 48 h	12 a 48 h	12 a 48 h	12 a 48 h	12 a 48 h
Biomassa no início da fase exponencial (g/L)	1,310	1,660	0,600	0,626	0,693
Goma produzida na fase exponencial (g/L)	2,800	5,345	8,870	4,280	4,650
Velocidade específica de formação de produto (h^{-1})	0,059	0,089	0,411	0,189	0,186
Biomassa produzida na fase exponencial (g/L)	4,659	3,189	1,191	0,969	1,677
Velocidade específica de formação de biomassa (h^{-1})	0,099	0,053	0,055	0,043	0,067
Substrato consumido na fase exponencial (g/L)	9,100	9,416	11,071	8,741	9,959
Velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1})	0,193	0,157	0,512	0,388	0,399

As velocidades específicas de produção de biomassa não foram calculadas para a fase estacionária de crescimento nos processos onde foram utilizados

extrato de levedura, peptona, nitrato de potássio e sulfato de amônio porque nestes casos, a biomassa final foi menor que a biomassa no início da fase estacionária, ou seja nestes processos a fase estacionária não está perfeitamente definida e se confunde com a fase de declínio.

TABELA 23. Velocidades específicas do processo de produção de goma xantana na fase estacionária de crescimento.

	Fontes de nitrogênio				
	extrato de levedura	peptona	nitrato de potássio	sulfato de amônio	uréia
Intervalo de Crescimento estacionário	48 a 96 h	48 a 96 h	48 a 96 h	48 a 96 h	48 a 96 h
Biomassa no início da fase estacionária (g/L)	5,969	4,849	1,791	1,595	2,370
Goma produzida na fase estacionária (g/L)	6,170	2,410	3,510	2,445	2,440
Velocidade específica de formação de produto (h^{-1})	0,022	0,010	0,041	0,032	0,021
Biomassa produzida na fase estacionária (g/L)	-	-	-	-	0,138
Velocidade específica de formação de biomassa (h^{-1})	-	-	-	-	0,0012
Substrato consumido na fase estacionária (g/L)	7,070	6,048	7,067	4,523	4,860
Velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1})	0,025	0,026	0,082	0,059	0,043

Comparando-se as velocidades específicas de formação de produto e de consumo de substrato de uma mesma fonte de nitrogênio, observa-se que sempre os valores obtidos para a fase estacionária do processo são menores do que os valores obtidos na fase exponencial de crescimento. Isto mostra que o processo é mais eficiente na fase exponencial de crescimento. Muito embora a produção de goma xantana seja importante após a fase exponencial de crescimento, a grande produção específica se dá na fase exponencial de crescimento.

4.10 Análises da Goma Xantana Produzida com as Fontes Alternativas de Nitrogênio Testadas

As gomas xantanas produzidas com as várias fontes alternativas de nitrogênio testadas, solúveis em água, produzidas nos testes de fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com extrato de levedura, peptona, nitrato de potássio, sulfato de amônio e uréia, foram precipitadas com 2,5 volumes de etanol hidratado e estão mostradas na figura 55.

A goma xantana produzida com as fontes de nitrogênio alternativas testadas, após secas e moídas, foram submetidas à análise reológica e análise no espectrômetro infra-vermelho para se avaliar seu comportamento reológico e para se determinar se os produtos finais de cada fermentação apresentavam diferenças em suas propriedades.

4.10.1 Testes Reológicos

A viscosidade de soluções de compostos macromoleculares é influenciada por uma série de fatores, tais como o tamanho e a conformação da macromolécula, o seu volume em solução, sua massa molecular e sua distribuição espacial, a concentração do polímero em solução, a flexibilidade da cadeia, além da temperatura e velocidade de cisalhamento empregada para determinação da medida (BRETAS, 1987; GRAESSLEY, 1980; YALPANI & SANDFORD, 1987).

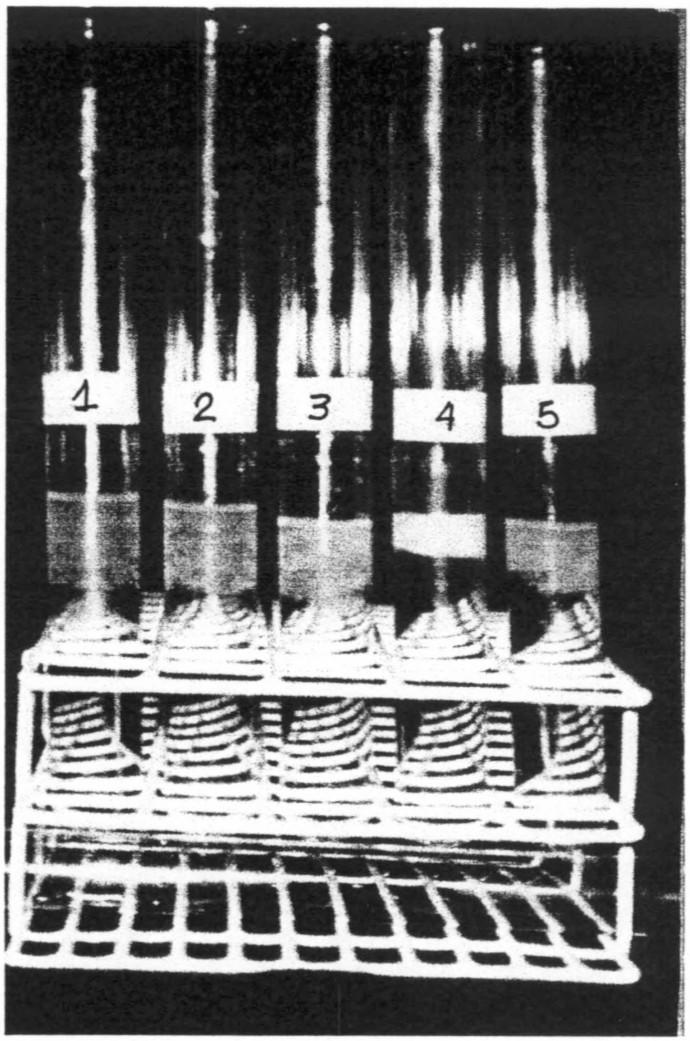


FIGURA 55. Goma xantana produzida na fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca, suplementado com fontes alternativas de nitrogênio. (1) extrato de levedura, (2) peptona, (3) nitrato de potássio, (4) sulfato de amônio, (5) uréia.

A viscosidade das soluções preparadas em meio aquoso (0,1 M de NaCl), com as gomas obtidas na fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com as fontes alternativas de nitrogênio, foram de determinadas, comparadas com solução preparada da mesma forma com amostra comercial de goma xantana.

A concentração da goma utilizada para o preparo das soluções foi de 1 g/L. As figuras de 56 a 61, apresentam os dados obtidos nas determinações realizadas.

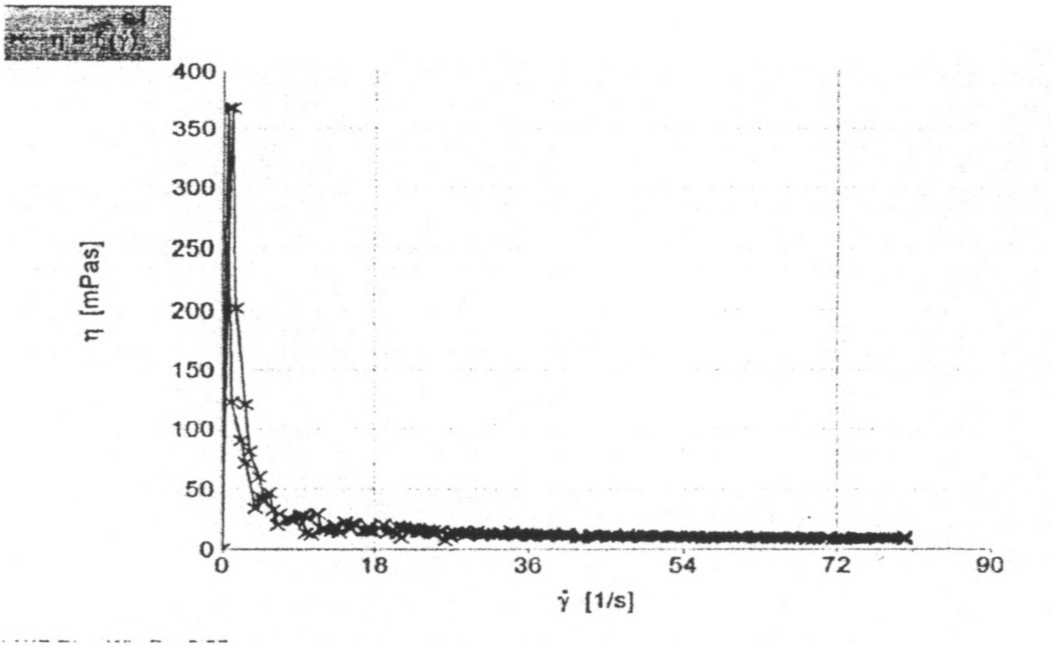


FIGURA 56. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

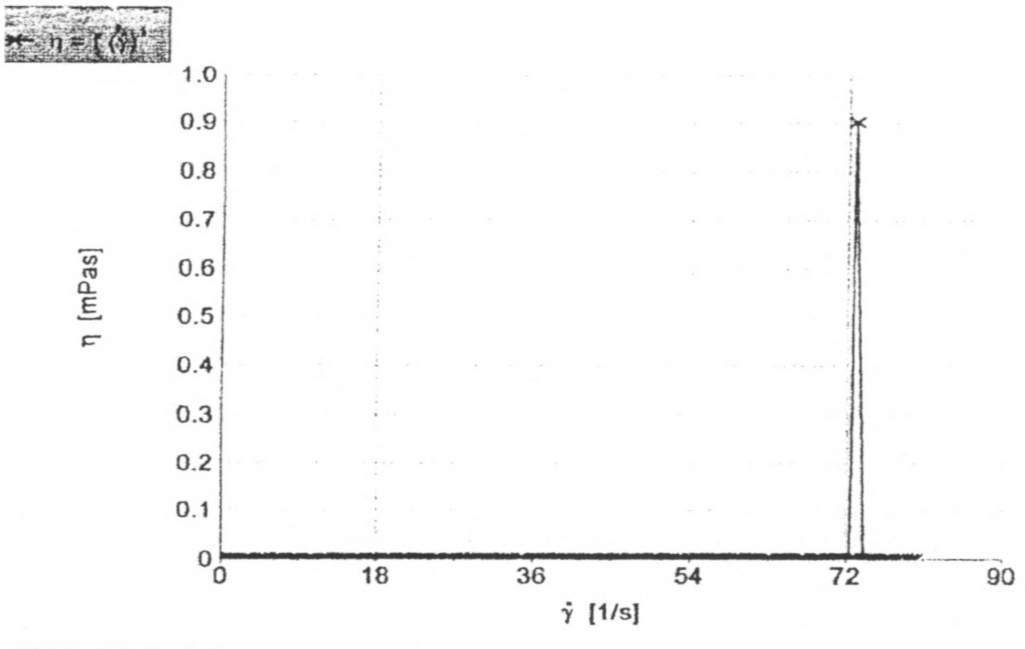


FIGURA 57. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com peptona como fonte de nitrogênio.

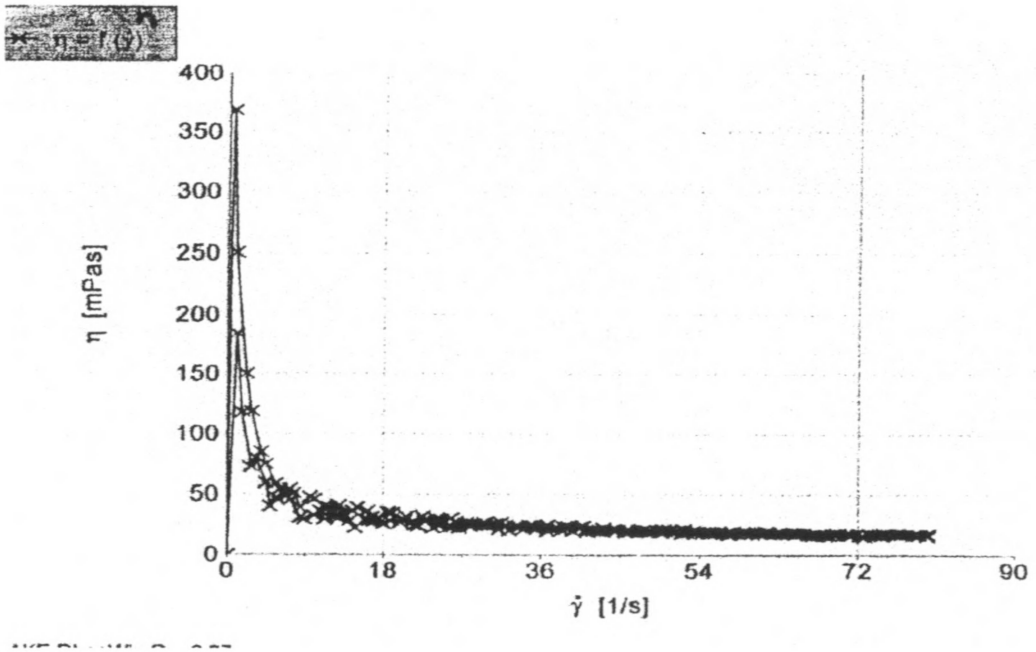


FIGURA 58. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.

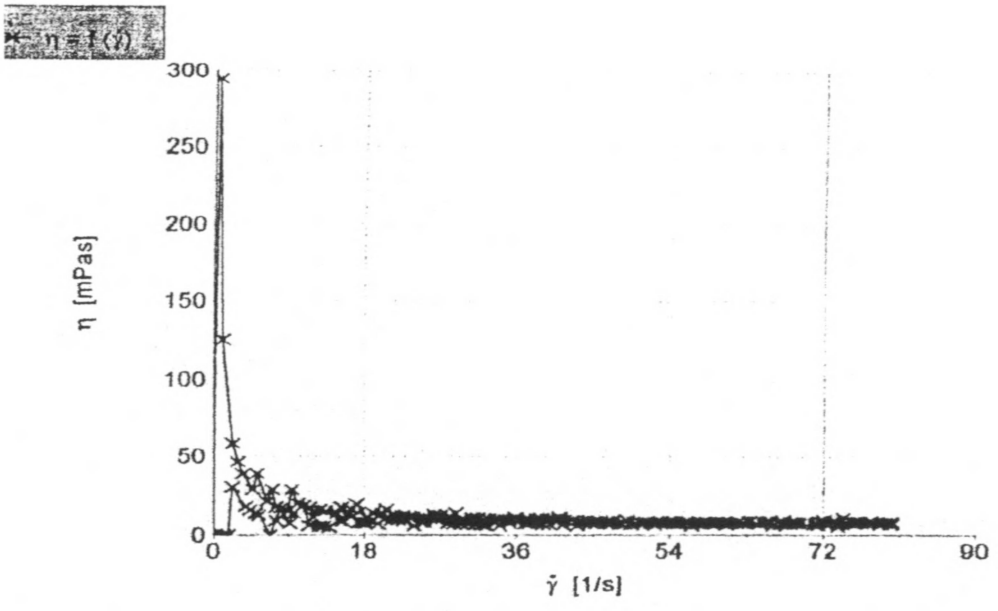


FIGURA 59. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

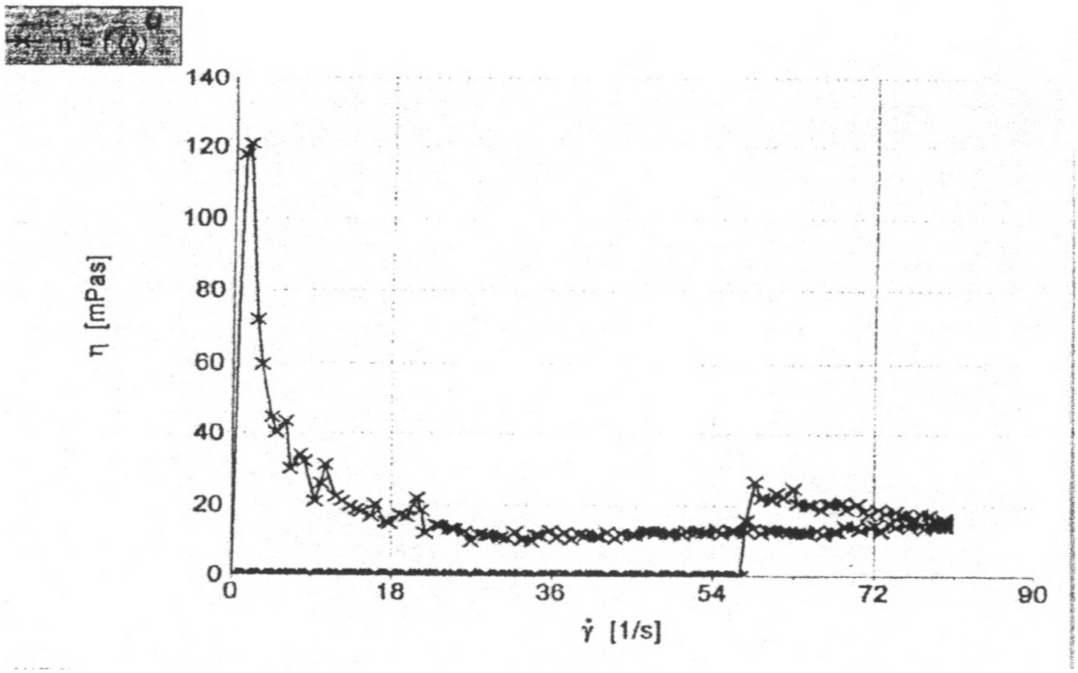


FIGURA 60. Determinação da viscosidade da solução de 1,0 g/L de goma xantana em NaCl 0,1 M produzida com hidrolisado de bagaço de mandioca suplementado com uréia como fonte de nitrogênio.

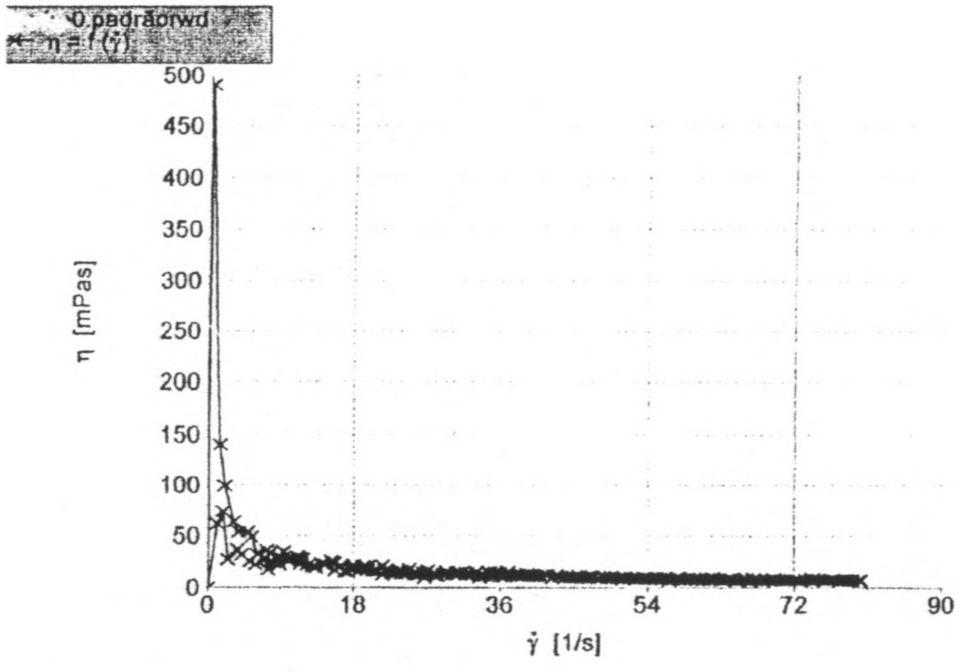


FIGURA 61. Determinação da viscosidade da solução de goma xantana comercial em NaCl 0,1 M.

Dos gráficos das figuras de 56 a 61 foram determinada a viscosidade das soluções preparadas com os polissacarídeos sintetizados com as fontes alternativas de nitrogênio, bem como da goma xantana comercial avaliada. A viscosidade é projetada no eixo das ordenadas, no patamar Newtoniano, ou seja, quando a viscosidade permanece constante.

As viscosidades determinadas estão representadas na tabela 24.

TABELA 24. Viscosidade medida das soluções preparadas com as gomas xantanas comercial e produzidas pela *Xanthomonas campestris*, com as fontes de nitrogênio testadas.

Amostra	Viscosidade (mPa)
Goma xantana comercial – Kelco (Monsanto)	35,5
Goma produzida com extrato de levedura	35
Goma produzida com peptona	0,01
Goma produzida com nitrato de K	40
Goma produzida com sulf. de amônio	20
Goma produzida com uréia	12

4.10.2 Análises por Infra-vermelho

Para avaliar a presença ou não de substituintes estranhos na cadeia polissacarídica das gomas xantanas obtidas nos processos fermentativos com as fontes alternativas de nitrogênio testadas, as amostras obtidas foram submetidas a análise por espectroscopia de infra-vermelho, em pastilhas de KBr.

O teste foi comparativo com uma amostra comercial de goma xantana, produzida e comercializada pela Kelco empresa do grupo Monsanto.

Os espectros obtidos nas análises das amostras testadas e da amostra comercial estão mostrados na figura 62.

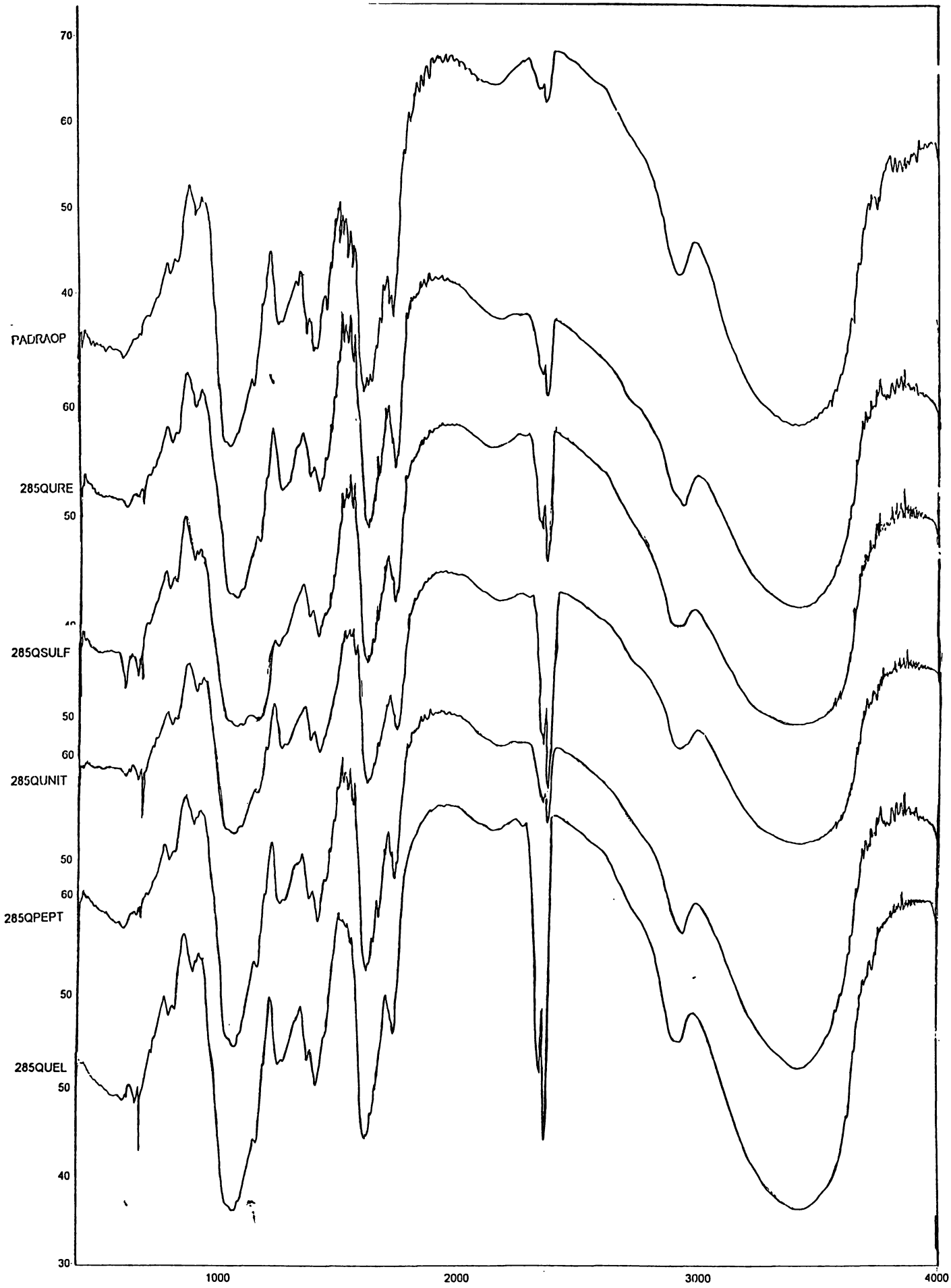


FIGURA 62. Espectro de IV das amostras de goma xantana obtidas por fermentação com fontes alternativas de nitrogênio e da amostra comercial de goma xantana da Kelco.

As análises de absorção na faixa do infra-vermelho confirmaram, pelo perfil de espectro obtido, que não foram detectados nas gomas xantanas produzidas por fermentação em laboratório com as fontes alternativas de nitrogênio testadas, nenhum grupamento substituinte na cadeia, diferente dos existentes no produto comercial analisado.

Pode-se observar a semelhança das bandas de absorção nos vários comprimentos de onda, comparando-se os produtos obtidos na fermentação com as fontes de nitrogênio testadas entre si e com a mostra comercial, tomada como padrão. Isto mostra que, os produtos produzidos com as fontes alternativas de nitrogênio têm, tanto estruturas básicas quanto substituintes na cadeia carbônica semelhantes entre si e semelhantes à amostra comercial analisada.

A análise foi feita para termos a comparação entre os produtos produzidos e o produto comercial de mercado, e confirma que os produtos obtidos nos testes fermentativos com as fontes alternativas de nitrogênio não têm nenhum radical diferente incorporado à cadeia, e tem composição semelhante à amostra comercial da Kelco.

A verificação da conformação, tamanho e ordenação da cadeia polissacarídica, não foram analisados neste trabalho na tentativa de explicar as diferenças existem no valor das viscosidades determinadas.

4.10.3 Análise de nitrato na goma xantana produzida com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio

Mesmo apresentando o espectros de absorção na faixa do infra-vermelho idênticos quando comparados com a amostra comercial distribuída no Brasil pela Monsanto, mostrando que o radical nitrato não está incorporado na cadeia do polissacarídio produzido, foi determinado o teor de nitrato residual na goma xantana produzida com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. Isto foi feito com o objetivo de determinar se na goma xantana produzida havia ou não nitrato residual. Como no meio havia um quantidade de nitrato de potássio, nitrato residual poderia estar misturado ao produto, como resíduo do processo de

recuperação da goma xantana. Esta análise garante a securidade do produto para fins alimentícios, pois o teor de nitrato em produtos da indústria de alimentos é variável dependendo do produto e da portaria governamental. Para produtos cárneos, por exemplo, o teor de nitrato permitido é de 0,03 g/100 g de produto, de acordo com a portaria 1004 de 11.12.98 da Secretaria de Vigilância Sanitária.

O teor de nitrato na goma xantana produzida por fermentação utilizando nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, foi determinado em uma solução com concentração de 1 g/L de goma xantana.

O teor de nitrato na solução assim preparada estava abaixo da faixa de detecção do método utilizado (Standard Methods, 1998) que é de 1 mg NO_3^-/L. Ou seja 1 g de goma xantana apresenta nitrato residual abaixo de 1 mg NO_3^-/L. O laudo da análise realizada está apresentada nos anexos deste trabalho.

4.11 Teste de Fermentação em Fermentador de Bancada

O teste de aumento de escala foi feito com o objetivo de verificar o comportamento do processo fermentativo em biorreator, já que todos os testes anteriores foram feitos em pequena escala, usando erlenmeyers de 250 mL e um volume de 50 mL de meio fermentativo.

Os resultados de açúcar redutor residual, biomassa formada e goma xantana produzida medidos a cada 8 horas estão mostrados na figura 63.

O tempo de fermentação necessário para que seja consumido mais de 90% do açúcar redutor presente no meio, também confirma o dado obtido em escala de laboratório, mostrado que 80 horas de fermentação é o tempo ideal. Este valor confirma também os dados da literatura.

ATKINSON & MAVITUNA, 1987, relata que 80 horas é o tempo médio do processo fermentativo de produção de goma xantana com a bactéria *Xanthomonas campestris,* e GARCIA-OCHOA, 2000, relata tempos de fermentação entre 40 e 120 horas dependendo do tipo de bioreator utilizado.

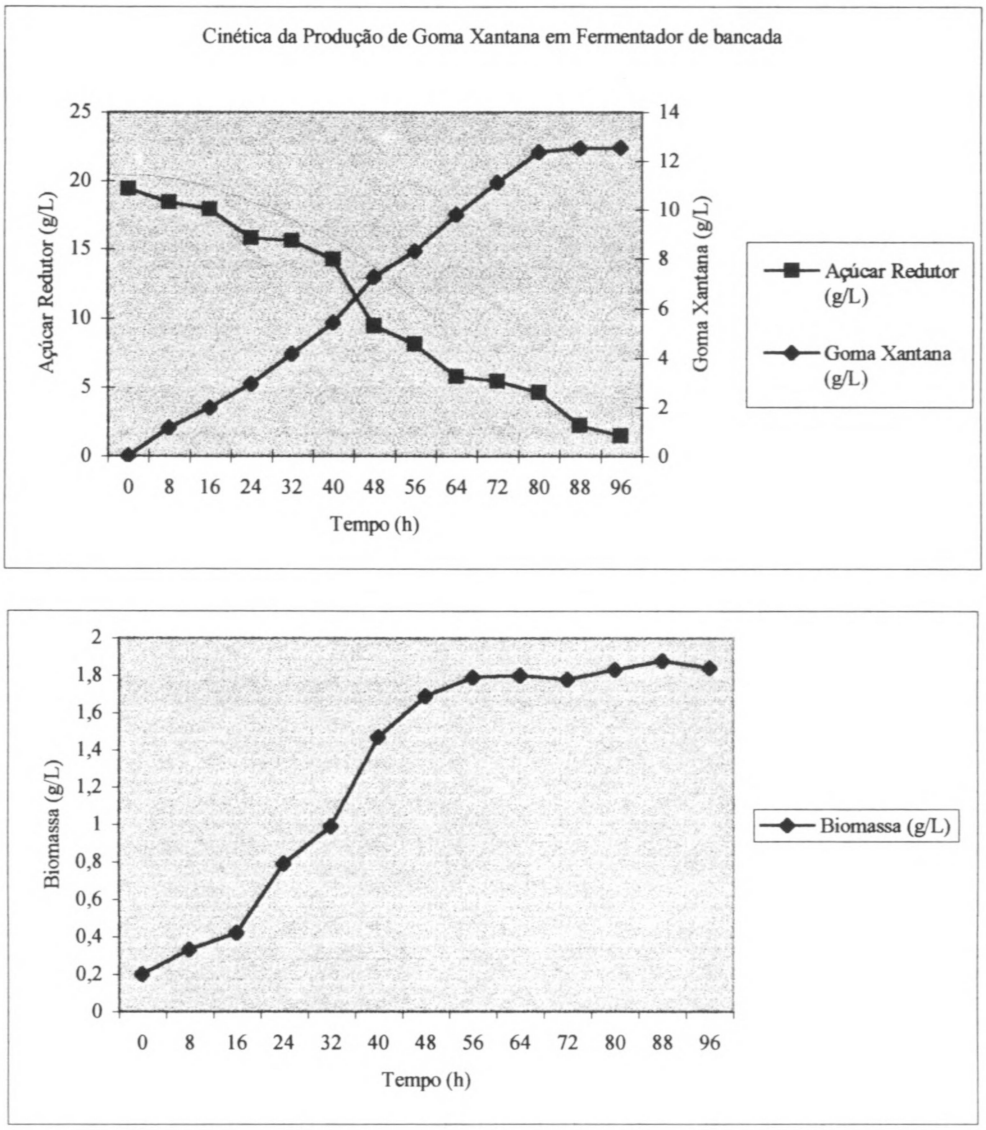


FIGURA 63. Cinética da fermentação do hidrolisado de bagaço de mandioca com concentração inicial de açúcar redutor de 19,36 g/L, com a bactéria *Xanthomonas campestris*, em fermentador com capacidade de 8 L., usando nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.

Observa-se que o consumo de açúcar, e a produção de biomassa em escala semi-piloto, estão de acordo com os dados obtidos nos ensaios em frascos erlenmeyers, apenas a produção de goma xantana foi levemente menor, 12,56, para o fermentador de bancada, contra 14,05 para a fermentação em frascos erlenmeyer. Esta leve diminuição pode ser atribuída à perda de eficiência na aeração do meio. Mas de modo geral os resultados mostram que o processo pode

ser feito em escala maior sem prejuízo nas eficiências obtidas em escala de laboratório.

4.11.1 pH do meio de fermentação

No teste de fermentação em bioreator de bancada foi medido a evolução do pH do caldo de fermentação ao longo do processo e os resultados estão mostrados na tabela 25.

TABELA 25. Variação do pH do meio de fermentação na produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris.*

Tempo (h)	pH
0	7,2
8	7,34
16	7,48
24	7,27
32	7,16
40	7,08
48	6,97
56	6,57
64	5,83
72	5,39
80	4,90
88	4,43
96	4,26

Os dados de pH obtidos no processo de produção da goma xantana por fermentação com a bactéria *Xanthomonas campestris,* mostrou um pequeno aumento nas primeiras 16 horas de fermentação diminuindo na seqüência, chegando em 4,26 ao final da fermentação. Isto confirma os dados relatados por

CASAS, 2000, mostrando que os grupos ácidos ligados à cadeia glicídica da goma xantana são os responsáveis pelo abaixamento do pH do meio.

4.11.2 Fatores de conversão do processo fermentativo em reator de 8 L.

A avaliação da fermentação em fermentador de 8 L. foi feita determinando-se os fatores de conversão do processo, cujos valores estão apresentados na tabela 26.

TABELA 26. Parâmetros inicial e final, com os fatores de conversão de substrato em biomassa e em goma xantana, calculados a partir dos dados levantados na cinética da fermentação com a *Xanthomonas campestris* do hidrolisado de bagaço de mandioca em fermentador de 8 L.

Parâmetro	Valor
Açúcar redutor inicial (g/L)	19,36
Açúcar redutor final (g/L)	1,50
Açúcar redutor consumido (g/L)	17,86
Máxima biomassa produzida (g/L)	1,88
Fator de conversão substrato em biomassa ($Y_{X/S}$)	0,1053
Goma xantana máxima produzida (g/L)	12,56
Fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$)	0,7032
Fator de conversão substrato em produto %	70,32

Os dados da tabela 26 estão de acordo com os parâmetros calculados para o processo fermentativo realizado em erlenmeyer. Apenas a produção de goma e o fator de conversão de substrato em produto, foram um pouco menor do que o produzido em erlenmeyer.

4.11.3 Parâmetros cinéticos do processo fermentativo em reator 8 L.

Os parâmetros cinéticos também são números importantes para avaliação do processo fermentativo. Para a fermentação em biorreator de 8L foram calculados e estão apresentados na tabela 27. Os valores calculados estão de acordo com os valores determinados nos estudos em frascos erlenmeyer, apresentados na tabela 21.

TABELA 27. Parâmetros cinéticos das fermentações realizadas a *Xanthomonas campestris*, com o hidrolisado de bagaço de mandioca com nitrato de potássio em reator de 8 L.

Parâmetro	Valor
Goma xantana produzida (g/L)	12,54
Tempo (h)	84
Velocidade Volumétrica de formação de produto (g/L.h)	0,1493
Máxima Biomassa Produzida (g/L)	1,88
Tempo (h)	84
Velocidade Volumétrica de formação de biomassa (g/L.h)	0,022
Substrato consumido em 96 horas (g/L)	17,86
Velocidade Volumétrica de consumo de substrato (g/L.h)	0,186

4.11.4 Velocidades específicas do processo fermentativo em reator de 8 L.

A figura 64 mostra a variação das velocidades específicas de consumo de substrato (Q_S), de formação do produto (Q_P) e de produção de biomassa (Q_X), ao longo da fermentação de produção da goma xantana em fermentador de 8 L.

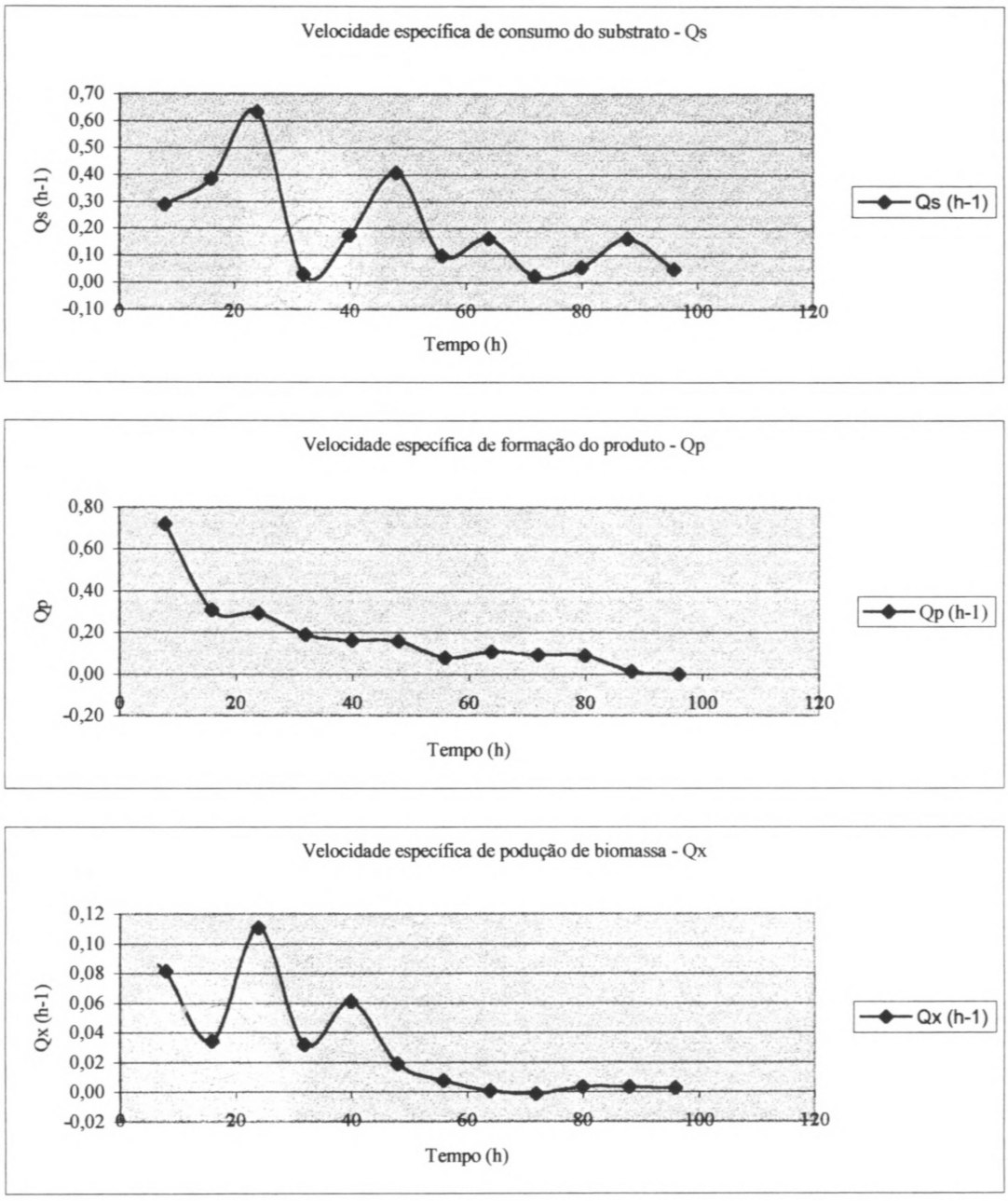


FIGURA 64. Velocidades específicas de consumo de substrato, de formação de produto e de biomassa, na fermentação para produção de goma xantana em fermentador de 8 L.

As velocidades específicas de consumo de substrato (Q_S), de formação do produto (Q_P) e de produção de biomassa (Q_X), são importantes e servem para comparar as velocidades das transformações em diferentes concentrações de biomassa. É um indicativo das eficiências do processo a partir da biomassa existente no meio.

Observa-se que, a menos de alguns valores atípicos, onde provavelmente aconteceram erros analíticos, existe uma tendência de diminuição das velocidades específicas, ao longo do processo fermentativo. Isto pode ser atribuído à dificuldades de transferência de massa e de difusão de oxigênio, que ocorre com o aumento da viscosidade do meio na medida que a goma xantana é sintetizada e liberada no meio de fermentação.

A figura 65 mostra o fermentador em operação.

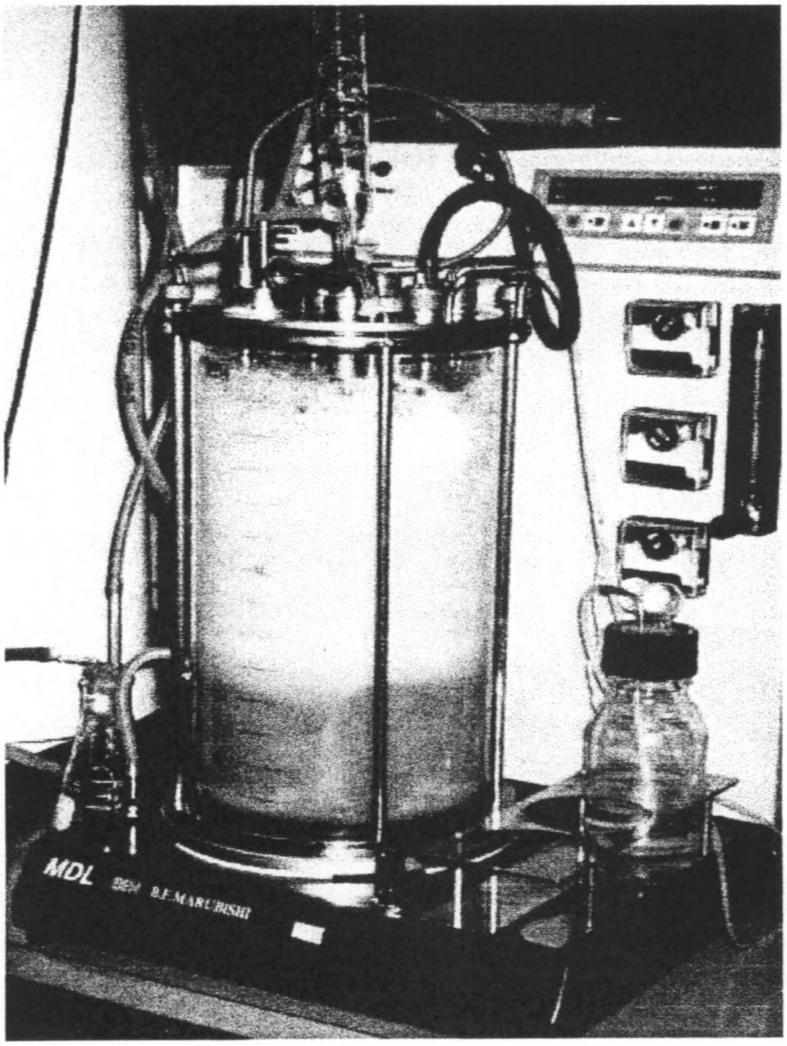


FIGURA 65. Fermentador de 8L em operação na produção de goma Xantana.

4.12 Ensaio de secagem da Goma Xantana em secador-pulverizador

O ensaio de secagem da goma produzida em escala semi-piloto, foi feito com o objetivo de verificar as condições operacionais de secagem do produto utilizando um equipamento de secagem em escala de laboratório. Foi utilizado o secador-pulverizador, porque este processo é citado na literatura como um dos processos indicados para secagem de goma xantana.

O produto seco recolhido no ciclone se apresentou como um pó fino e uniforme. O ciclone em operação está mostrado nas figuras 66 e 67.

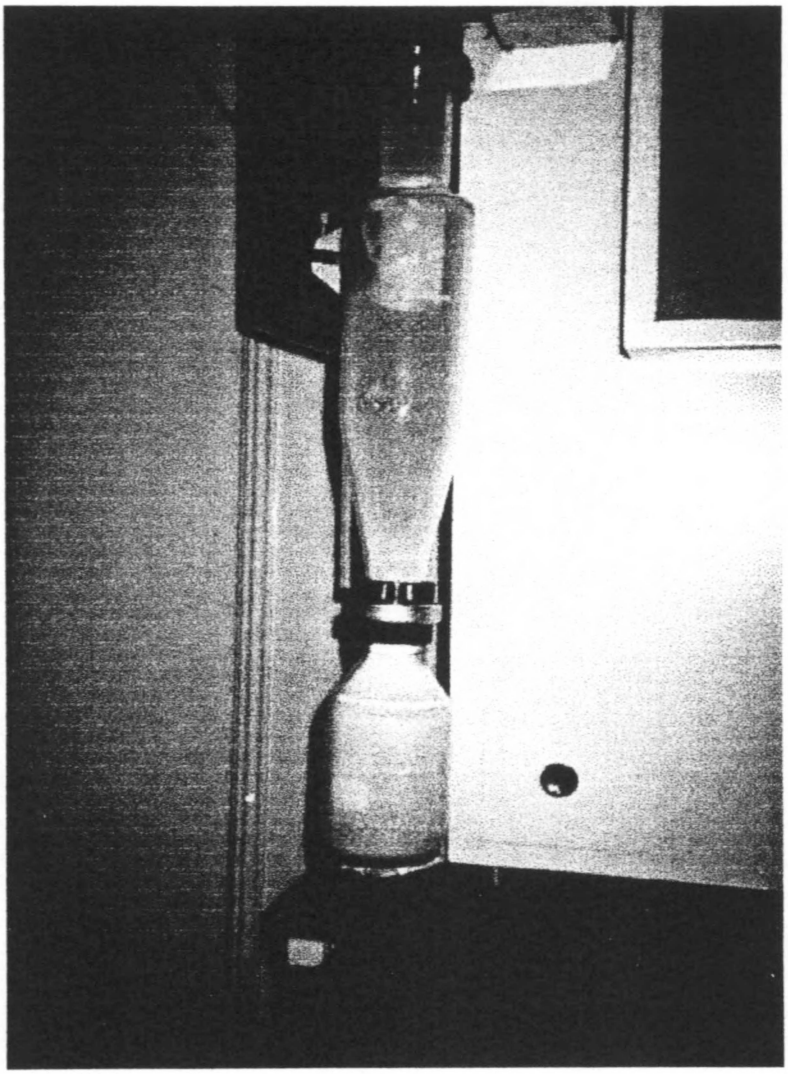


FIGURA 66. Ciclone do secador-pulverizador, mostrando a goma xantana seca.

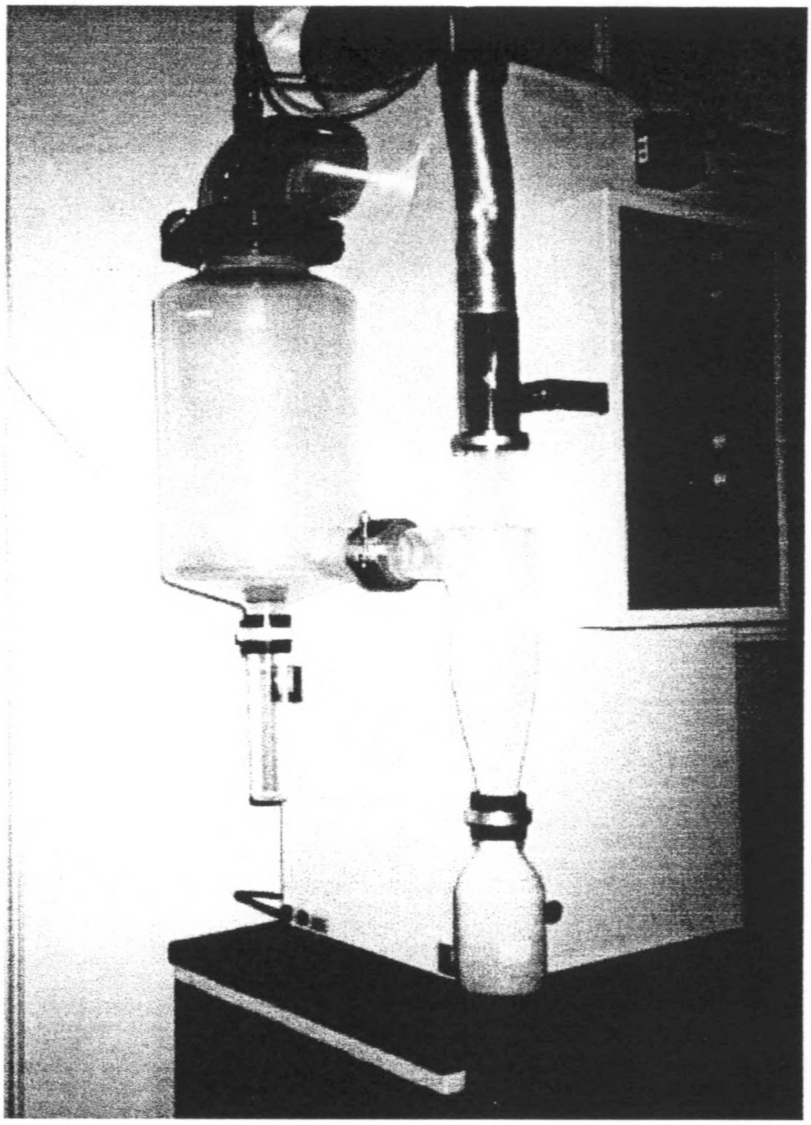


FIGURA 67. Secador-pulverizador de laboratório em operação.

A secagem da goma xantana no secador-pulverizador foi feita e otimizada para os seguintes parâmetros:

- Altura x diâmetro da câmara de secagem: 470 x 220 mm
- Taxa de evaporação de água com temperatura de entrada de 250°C, usando câmara de evaporação standard: ~1500 mL/h
- Vazão de líquido para o bico aspersor: 450-500 mL/h
- Vazão de ar necessário para o processo: 50 m^3/h
- Temperatura do ar na entrada do bico aspersor: 180°C
- Temperatura de vaporização da amostra: 92-95°C.

As condições de operação devem ser testadas a ajustadas experimentalmente para cada sólidos que se deseja secar. No processo de secagem da goma xantana foi tomado com base, as condições operacionais de secagem de leite desnatado, a após os valores experimentais de temperatura de secagem, vazão do líquido, temperatura do ar se secagem foram sendo ajustadas até que se obteve o rendimento de secagem e o produto nas condições desejadas, como um pó finamente separado e seco.

Não encontramos na literatura dados relativos à secagem da goma xantana para comparação com os dados obtidos. A partir destes dados levantados em laboratório, é feito o dimensionamento de secadores-pulverizadores industriais.

5 CONCLUSÃO

Resíduos do processamento de produtos agroindustriais, tais como a casca de café e o bagaço de mandioca, são resíduos sólidos industriais praticamente inexplorados, e que pelo seu teor de matéria orgânica e de açúcar, na forma diretamente fermentescível ou na forma de polímero se apresentam como resíduos altamente poluidores. Estes resíduos, simplesmente dispostos no meio ambiente são altamente poluidores e 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, agregar valor a estes resíduos e oferecer à indústria a opção de substratos alternativos baratos para diminuir os custos de produção de produtos industriais.

Em termos de custos, 1 tonelada de mandioca custa R$ 50,00 e kg de café em côco custa R$ 1,00 a 1,20. Neste trabalho e um processo completo foi desenvolvido para a produção de goma xantana a partir de resíduos destas agroindústrias, onde o produto produzido, a goma xantana custa US$ 23.00/kg, em média R$ 64,00/kg.

Dos estudos realizados com o objetivo de desenvolver um processo de utilização de casca de café e de bagaço de mandioca para a produção de goma xantana em fermentação aeróbia com a bactéria *Xanthomonas campestris,* pode-se concluir:

- Após submetidos à processos de hidrólise térmica, tanto as cascas de café quanto o bagaço de mandioca, produzem hidrolisados, ou seja xaropes com altos teores de açúcar diretamente fermentescíveis, e viáveis para a utilização em processos fermentativos.
- As condições físicas ótimas para a produção dos hidrolisados de casca de café são: Temperatura de 120°C e tempo de hidrólise de 12 a 14 minutos. Nestas condições, a recuperação de açúcares fermentescíveis presentes na casca de café é da ordem de 67%.

- A auto-hidrólise das cascas de café, assim chamada pois não é utilizado nenhum agente químico, ácido ou básico externo, para acelerar o processo de hidrólise, produz um xarope com açúcares solúveis, diretamente fermentescíveis. Além dos açúcares, estão presentes no meio, compostos recalcitrantes, como cafeína e taninos, que dão ao hidrolisado características de toxidez, e antocianinas que conferem cor ao hidrolisado.
- O pré-tratamento dos hidrolisados de casca de café, com carvão ativo diminui o teor de cafeína e taninos, mas não dinimui a cor. Também não melhora o resultado final da fermentação.
- Os hidrolisados de casca de café pré-tratado com carvão ativo ou não, são substratos viáveis para a produção de goma xantana em processo fermentativo com a *X. campestris,* Mas a goma xantana produzida é fortemente colorida pela precipitação com a goma xantana de antocianinas, compostos que conferem cor ao hidrolisado.
- As condições físicas ótimas para a produção dos hidrolisados de bagaço de mandioca são: Temperatura de 120°C e tempo de hidrólise de 10 a 12 minutos, e concentração de ácido clorídrico de 1,0 a 1,2%. Nestas condições, a recuperação de açúcares fermentescíveis presentes na casca de café é da ordem de 95%.
- Os hidrolisados de bagaço de mandioca suplementados com várias fontes de nitrogênio, são substratos viáveis para a produção de goma xantana por fermentação com a *X. campestris.*
- Extrato de levedura, peptona, nitrato de potássio, sulfato de amônio e uréia são fontes de nitrogênio possíveis de serem utilizadas no processo fermentativo.
- O consumo de açúcar redutor pelo microrganismo é limitado. Concentrações de 20 g/L de açúcar redutor no início da fermentação foram as consideradas ótimas para o processo. Concentrações maiores não são aproveitadas, restando muito açúcar residual no meio.
- O acúmulo de goma xantana no caldo fermentado, aumento muito a viscosidade do meio, dificultando os processos de transferência de massa, e

de difusão de oxigênio no meio de fermentação. Isto limita a assimilação do substrato pelo microrganismo.

- A melhor produção de goma xantana foi obtida com o uso de nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, com um fator de conversão de substrato em produto da ordem de 75%, fator de conversão de substrato em biomassa da ordem de 10 % e um consumo de substrato da ordem de 94%.
- Análises de absorção na região do infra-vermelho, mostraram que as gomas xantanas produzidas com as várias fontes de nitrogênio testadas tem estrutura semelhantes entre si e semelhantes à amostra de goma xantana comercial, distribuída no Brasil pela Monsanto.
- Análises reológicas, realizadas com soluções diluídas preparadas com as gomas xantanas produzidas com as várias fontes de nitrogênio testadas, mostraram que as gomas produzidas com nitrato de potássio e com extrato de levedura, apresentaram viscosidade aparente semelhantes da ordem de 35 a 40 mPa, semelhante á viscosidade aparente medida na solução preparada nas mesmas condições com a goma xantana comercial.
- O ensaio de fermentação com o fermentados de bancada com capacidade de 8 L, mostrou que o processo é viável em escala maior.
- O pH do meio de fermentação baixou como resultado de grupamentos ácidos que estão ligados á cadeia do exopolissacarídeo produzido, mas o abaixamento no pH não inibiu a produção da goma.
- O hidrolisado ácido e o hidrolisado enzimático de bagaço de mandioca, são semelhantes quanto à resposta do processo fermentativo para a produção de goma xantana com a bactéria *X. campestris,* não havendo diferenças significativas entre os dois substratos quanto à produção de goma xantana, produção de biomassa e consumo do substrato.
- Se considerarmos as eficiências determinadas neste trabalho, em números inteiros a produtividade de goma xantana é de 14 g de goma xantana a partir de 33 g de bagaço de mandioca.
- Os resultados obtidos neste trabalho, mostram que é possível desenvolver um bioprocesso para produção de goma xantana utilizando matérias primas

agrícolas de baixo custo como mandioca ou ainda os resíduos do seu processamento, produtos de baixo custo, como a bagaço de mandioca, usando os seus hidrolisados ácidos ou enzimáticos, que são xaropes de glucose, como substrato para o processo fermentativo.

- O bioprocesso desenvolvido produz uma biomolécula de alto valor comercial, gerando tecnologia brasileira para as nossas indústrias, oferencendo uma alternativa para agregar valor a um resíduo industrial tipicamente tropical e estimulando o agro negócio no Brasil.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos mostraram a viabilidade do bioprocesso desenvolvido utilizando mandioca ou o bagaço de mandioca na forma de hidrolisados, além de casca de café, como substrato na produção de goma xantana, por fermentação submersa. Entretanto alguns pontos ainda podem ser explorados como por exemplo:

- Estudos de otimização da hidrólise enzimática com enzimas imobilizada como forma de melhorar o processo de hidrólise do amido do bagaço de mandioca.
- Testes com enzimas de outras fontes e outros fabricantes com a finalidade de baixar os custos do processo.
- Seleção de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas, objetivando a obtenção de enzimas com custo mais baixo, e a utilização destas enzimas na hidrólise enzimática do amido do bagaço de mandioca.
- Estudos e validação do processo fermentativo de produção de goma xantana em escala semi-industrial.
- O uso de diferentes modelos cinéticos de alimentação de bioreatores de fermentação submersa, como por exemplo a fermentação contínua ou a semicontínua (batelada-alimentada) com o objetivo de aumentar a produção de goma xantana.
- O uso de duas ou mais fontes de nitrogênio, por exemplo uma orgânica e outra inorgânica, para verificar se pode ocorrer sinergismo entre elas, que favoreçam a produção de goma xantana.
- Testes e desenvolvimento de formulações para a utilização da goma xantana em diferentes produtos alimentícios.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos – Teoria e Prática.** Universidade Federal de Viçosa : Viçosa. 1999. 415 p.

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

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamental.** 2. ed. McGraw-Hill Book Company. Singapore. 1986. 984 p.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. **Xanthan gum biosyntesis and aplication: a biochemical/genetic perspective.** *Apll. Microbiol. And Biotechnol.* V. 50. p. 145-152, 1998.

BELTER, P. A.; CUSSLES, E. L.; HU, W. S. **Bioseparation, Downstream processing for Biotecnology.** New York : Wiley. 1988.

BEUX, M. R. Biofermentação de resíduos agroindustriais do Estado do Paraná no cultivo do fungo saprófita comestível *Lentínula edodes* (shiitake). **Dissertação de mestrado em Tecnologia Química,** ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. UFPr. Curitiba. 130 p. 1995.

BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos**. 2. ed., 1ª. reimpressão. São Paulo : Livraria Varela. 1992. 223 p.

BOBBIO, P. A. & BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 3ª. ed., São Paulo : Livraria Varela. 2001. 143 p.

BRAGA, R. M .C. & LIMA, M. A. G. A. **Caracterizacão de Linhagens de X*anthomonas campestris pv campestris* Produtoras de Goma Xantana.** Departamento de Engenharia Química, CT, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. Site: http://www.propesq.ufpe.br/anais/ctg/ctg29.htm

BRAMOSKI, A. Caracterização do crescimento e produção de compostos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais. **Dissertação de mestrado em Tecnologia Química,** ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. UFPr. Curitiba, 127 p. 1997.

BRAND, D. Detoxificação biológica da casca de café por fungos filamentosos em fermentação no estado sólido. **Dissertação de mestrado em Tecnologia Química,** ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. UFPr. 99 p. 1999.

BRAND, D.; PANDEY,A.; ROUSSOS, S.; RAND, I.; SOCCOL, C. R. Microbial degradation of caffeine and tannins from coffee hysk. In: **Coffee Biotechnology and Quality.** Proceedings of the 3rd International Seminar an Biotechnology in the coffee agro-industry. Ed: Sera, T.; Soccol, C. R.; Pandey, A.; Roussos, S. Netherlands : Kluwer Academic Publishers. P. 393-399, 2000.

BRESSANI, R.E. & ESTRADA, R. J. Pulpa y pergaminho de café. I composición química y contenido de aminoácidos de la proteine de la pulpa. **Turrielba.** V. 22. p. 199-304. 1979.

BRETAS, R. S. A reologia dos polímeros para leigos e iniciantes. **Plástico Moderno.** V. 176 : p. 28-35. 1987.

CARDOSO, O. **Café, cultura e tecnologia primária**. Lisboa : 1994

CARTA, F. S. Hidrólise enzimática de bagaço de mandioca e Produção de ácido fumárico por fermentação do fungo *Rhizopus.* **Dissertação de mestrado em Tecnologia Química**, ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná. .....p. 1999.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCIA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology.** V. 26. Is. 2-4 : p. 282-291. 2000.

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. P. 1-31. 1980.

FAN, L. Produção de fungo comestível do gênero *Pleurotus* em bio-resíduos agroindustriais. **Dissertação de mestrado em Tecnologia Química** ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. UFPr. Curitiba, 105 p. 1999.

FAN, L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; Solid State Fermentatio and frutification of Pleurotus ostreatus on the residues of coffee. **III Seminário Internacional sobre a Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira.** Londrina, 24-28 de maio, 1999.

GALINDO, E. & ALBITER, V. High-yield recovery of xanthan by precipitation with isopropyl álcool in a stirred tank. **Biotechnology Processing.** N. 12, p. 540-547. 1996.

GARCIA-OCHOA, F.; CASAS, J. A.; MOHEDANO, A. F. Precipitation of xanthan gum. **Separation Science Technology.** N. 28, p. 1303-1313. 1993.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances.** V. 18, I. 7. p.549-579. 2000.

GERMANO, S. Heparinóides produzidos por modificação química em galactomananas de sementes de *Cássia fastuosa* willd. E *Mimosa scabrella* Bentham. **Dissertação de mestrado em Bioquímica**. Departamento de Bioquímica. UFPr. Curitiba, 83 p. 1996.

GONZALEZ, R.; JOHNS, M. R.; GREENFIELD, P. F.; PACE, G. W. Xanthan gum precipitation using ethanol. **Process Biochemistry.** N. 24, p. 200-203. 1989.

GRASSLEY, W. W. Polymer chain dimension and the dependence of visco-elastic properties on concentration, molecular weight and solvent power. **Polymer**. V. 21, p. 258-262. 1980.

GRETHLEIN, H. E. Pretreatment for enhanced hydrolysis of cellulose biomass. **Biotechnological Advances.** N. 2. p.43-62 1984.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 1985. 523 p.

IPARDES. **Biotecnologia no Paraná.** Curitiba, 1986.

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

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

KENNEDY, J. F.; GRIFFITHS, A. J.; ATKINS, D. F. The applications of hydrocolloids: recent developments, future trends. In: **Gums and stabilizers for the food industry 2.** Cap. 6, p. 417 - 455. Phillips, G. O.; Wedloch, D. J.; Williams, P. A. Ed. Pergamon Press. Oxford. 1984.

KOLICHESKI, M. B. Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando como substrato bagaço de mandioca. **Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química,** ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná. 135 p. 1995.

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

LANAY, B.; CUVELIER, G. MARTINEZ-REYES, S. Xanthan gum in various solvent conditions: intrinsic viscosity and flow properties. In: **Gums and stabilizers for the food industry 2.** Cap. 2, p. 79-98. Phillips, G. O.; Wedloch, D. J.; Williams, P. A. Ed. Pergamon Press. Oxford. 1984.

LEELA, J. K. & SHARMA, G. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris.* **Bioprocess Engineering.** V. 23. p. 687-689. 2000.

LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHIMIDELL, W. **Coleção Biotecnologia Industrial.** Volume 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos. Edgard Blücher Ltda : São Paulo. 2001. 593 p.

LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. **Water Research.** V. 35. N. 7. p. 1828-1830. 2001.

MACCARI Jr, A. Uso da levedura amilolítica *Schwanniomyces castelli,* para hidrólise do amido de batata e produção de etanol. **Dissertação de mestrado em Tecnologia Química,** ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. UFPr. 108 p. 1997.

MACHADO, C. M. M. Produçãio de Ácido Giberélico por fermentação no estado sólido em bio-resíduos da agroindústria do café. **Dissertação de mestrado em Tecnologia Química**, ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. UFPr. 73 p. 2000.

MACHADO, C. M. M.; OLIVEIRA, B. M.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Coffee husk as substrate for the production of gibberelic acid by fermentation. **III Seminário Intrernacional sobre a Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira.** Londrina, 24-28 de maio, 1999.

MATHEWS, M. B. Conective tissue. Macromolecular structure and evolution. Berlin, Spring, p.93-206, 1975.

MATIELLO, O. **O café – do cultivo ao consumo**. São Paulo : 1991.

McCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P.; **Unit Operations of Chemical Engineering**. 5th Ed. McGraw-Hill Inc. New York. 1993. .....p.

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

MEDEIROS, A. B. P. Produção de compostos voláteis aromáticos por *Klüyveromyces marxianus* em fermentação no estado sólido da casca de café. **Dissertação de mestrado em Tecnologia Química**, ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. UFPr. 74 p. 1998.

MILAS, M.; RINAUDO, M. **Polieletrólitos.** Instituto de Física e Química de São Paulo – USP : São Carlos. 1991. 83 p.

MORRIS, V. J.; FRANKLIN, D.; ANSON, K. I. Rheology and microstructure of dispersions and solutions of microbial polysaccharides from *Xanthomonas campestris* (Xanthan gum). **Carbohydr. Res.** V. 121. p. 13-30, 1983.

PACE, G. W. & RIGHELATO, R. C. Production of extracelular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemistry Engineering.** N. 15, p. 41-70. 1981

PANDEY, A & SOCCOL, C. R.Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic approach. **Journal of Scientific & Industrial Research**. V. 59, p. 12-22, january, 2000.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUES-LEON, J. A.; NIGAM, POONAM. **Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications.** Nova Delhi : Asiatech Publishers, Inc. 2001. 221 p.

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

PAPI, R. M.; EKATERINIADOU, L. V.; BELETSIOTIS, E.; TYPAS, M. A.; KYRIAKIDIS, D. A. Xanthan gum and ethanol production by *Xanthomonas campestris* and *Zymomonas mobilis* from peach pulp. **Biotechnology Letters.** V. 21. Is. 1. p. 39-43. 1999.

PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis in the utilization of the hydrolysates. In: FIECHTER, A. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology.** V. 38. p. 53-87. Ed. Springer-Vering : Berlin. 1989.

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

PERRY, R. H. & CHILTON, C. H. **Chemical Engineers' Handbook.** 5th ed. Tokyo : McGraw-Hill Kogakusha Ltda., 1973.

PERRY, R. H. & CHILTON, C. H. **Manual de Engenharia Química.** Traduzido do original em inglês por: H. Macedo; L. M. Barbosa; P. E. de F. Barbosa. 5ª ed. Rio de Janeiro : Guanabara Dois, 1980.

PETTIT, D. J. Xantham Gum. In: **Polisaccharides in food.** Parte V, Cap. 17. Blanshard, J. M. V. & Mitchel, J. R. Eds. London, p. 263-282. 1979.

ROVERI, J. R. Palestra em Viscosimetria e Reologia. TECPAR – Instituto Tecnológico do Paraná. Curitiba, 1996. 11p.

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

SOARES, M. Biossíntese de metabólitos voláteis frutais por *Pachysolen tannophilus* e *Ceratocistis fimbriata* pela fermentação no estado sólido da casca de café.

Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química, ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. UFPr. 105 p. 1998.

SOCCOL, C. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; PANDEY, A. Produção de goma xantana por fermentação a partir de mandioca, batata e resíduos das agroindústrias cafeeira, de batata e de mandioca. **Patente Brasileira depositada no INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial** N. 1544 em 28.12.2000.

SOCCOL, C. R. Contribuição ao Estudo da Fermentação no Estado Sólido em Relação com a Produção de Ácido Fumárico, Biotransformação de Resíduo Sóçido de Mandioca por *Rhizopus* e Basidiomacromicetos do Gênero *Pleurotus.* **Tese de Concurso Públçico de Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos.** Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994.

SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M. Potencial of Fermentation for Production of L(+)Lactic Acid by *Rhizopus oryzae.* **Applied Microbiology and Biotechnology.** V. 41, p. 286-290. 1994a.

SOCCOL, C. R.; STONOGA, V. I.; RAIMBAULT, M. Production of L-lactic acid by *Rhizopus* species. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** V. 10, p. 433-435. 1994b.

STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington : APHA; AWWA; WEF. 1998.

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

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. **Dissertação de mestrado em Tecnologia Química,** ênfase

em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. UFPr. Curitiba, 1997.

WOICEICHOWSKI, A. L. Bioconversão de hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda,* obtido pelo processo de explosão a vapor, na produção de ácido L(+)Lático pelo fungo *Rhizopus oryzae.* **Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química,** ênfase em Tecnologia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná, 102 p. 1997.

WOICIECHOWSKI, A. L.; PANDEY, A.; MACHADO, C. M. M.; CARDOSO, E. B.; SOCCOL, C. R. Hydrolysis of coffee husk: Process optimization to recover its fermentable sugar. In: **Coffee Biotechnology and Quality.** Proceedings of the 3rd International Seminar an Biotechnology in the coffee agro-industry. Ed: Sera, T.; Soccol, C. R.; Pandey, A.; Roussos, S. Netherlands : Kluwer Academic Publishers. P. 409-417, 2000.

WOICIECHOWSKI, A. L.; CAMARGO, F.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C.R. Reducing sugar recovered at acid and enzimatic hydrolysis of cassava bagasse. **Anais do VII Encontro Regional Sul de Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

WOOD, T. M. & SADDLER, J. N. SO_2 prehydrolysis for high yields ethanol production from biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** N. 17. p. 33-34. 1988.

YALPANI, M.; & SANDFORD, P. A Commercial polysaccharides: recent trends and developments. In: YALPANI, M. **Industrial Polysaccharides: genetic engeneering, structure/properties, relations and applications.** Amsterdam : Elsevier, p. 311-335. 1987.

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

YANG, C. W.; LU, Z. J.; TSAO, G. T. Lactic acid production by pellets from *Rhizopus oryzae* in submerged system. **Applied Biochemistry and Biotechnology** N. 51, p. 57-71. 1995.

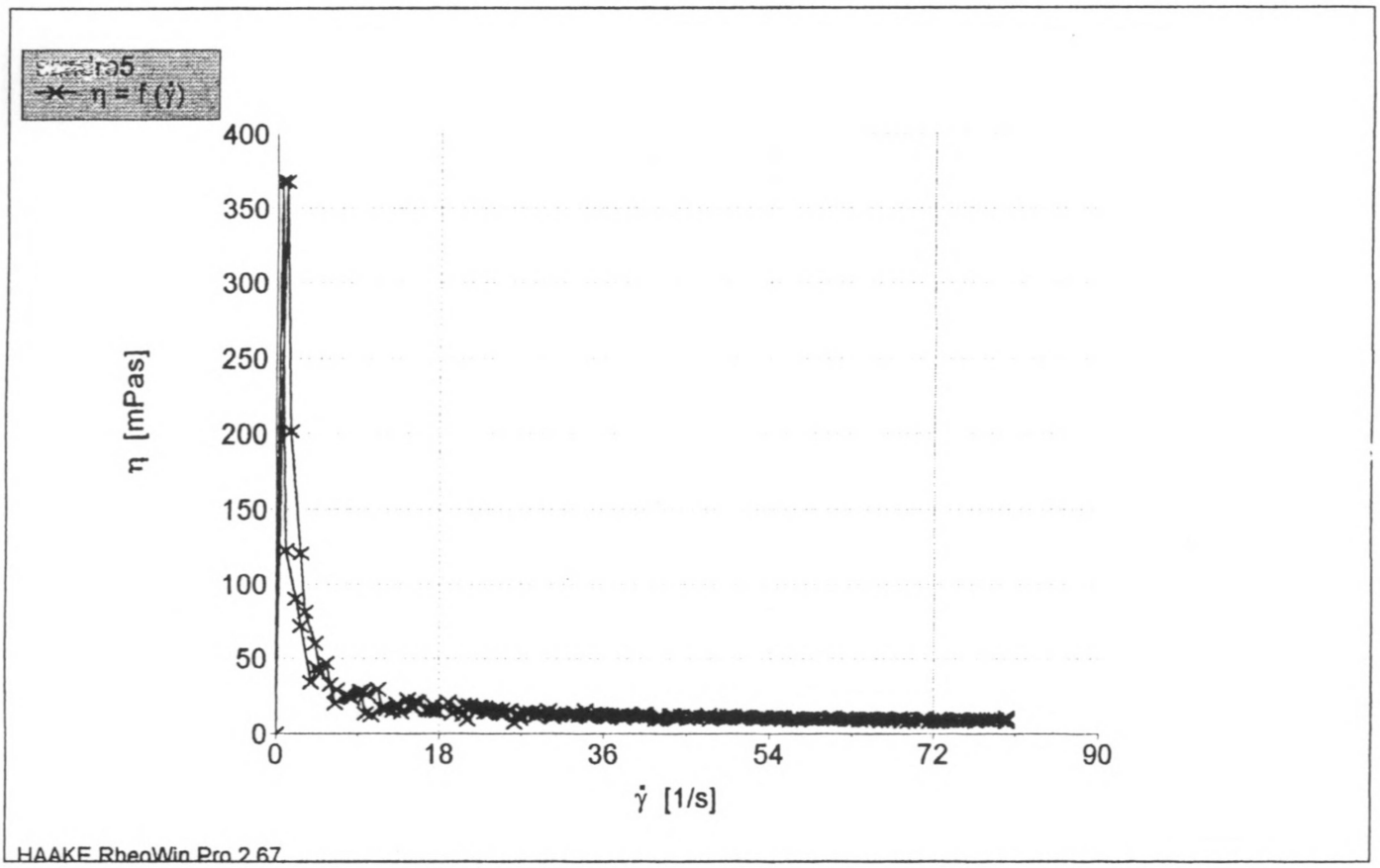
YOO, S. D.: HARCUM, S. W. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, V. 70.1, p. 13-15, 1999

ANEXO 1

ENSAIOS REOLÓGICOS DAS GOMAS XANTANAS PRODUZIDAS COM AS FONTES ALTERNATIVAS DE NITROGÊNIO

Companhia	UNIVALI	**Dispositivo de medi**	VT550		
Operador	UNIVALI	**Dispositivo de term**	DC30		
Data/Tempo	25.05.2001 / 10:34:09	**Sensor**	MV 1	**Fenda**	1.000 mm
Substância		**Fator A**	6570.000 Pa/Nm		
Amostra No.	5	**Fator-M**	22.350 1/s/(rad/s)		
Descrição	el				

Comentário



HAAKE RheoWin Pro 2.67

Nome do arquivo: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Data\sandro5.rwd

Trabalho: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Jobs\polímeros.rwj

Definição de elementos / Notas	**Avaliação**

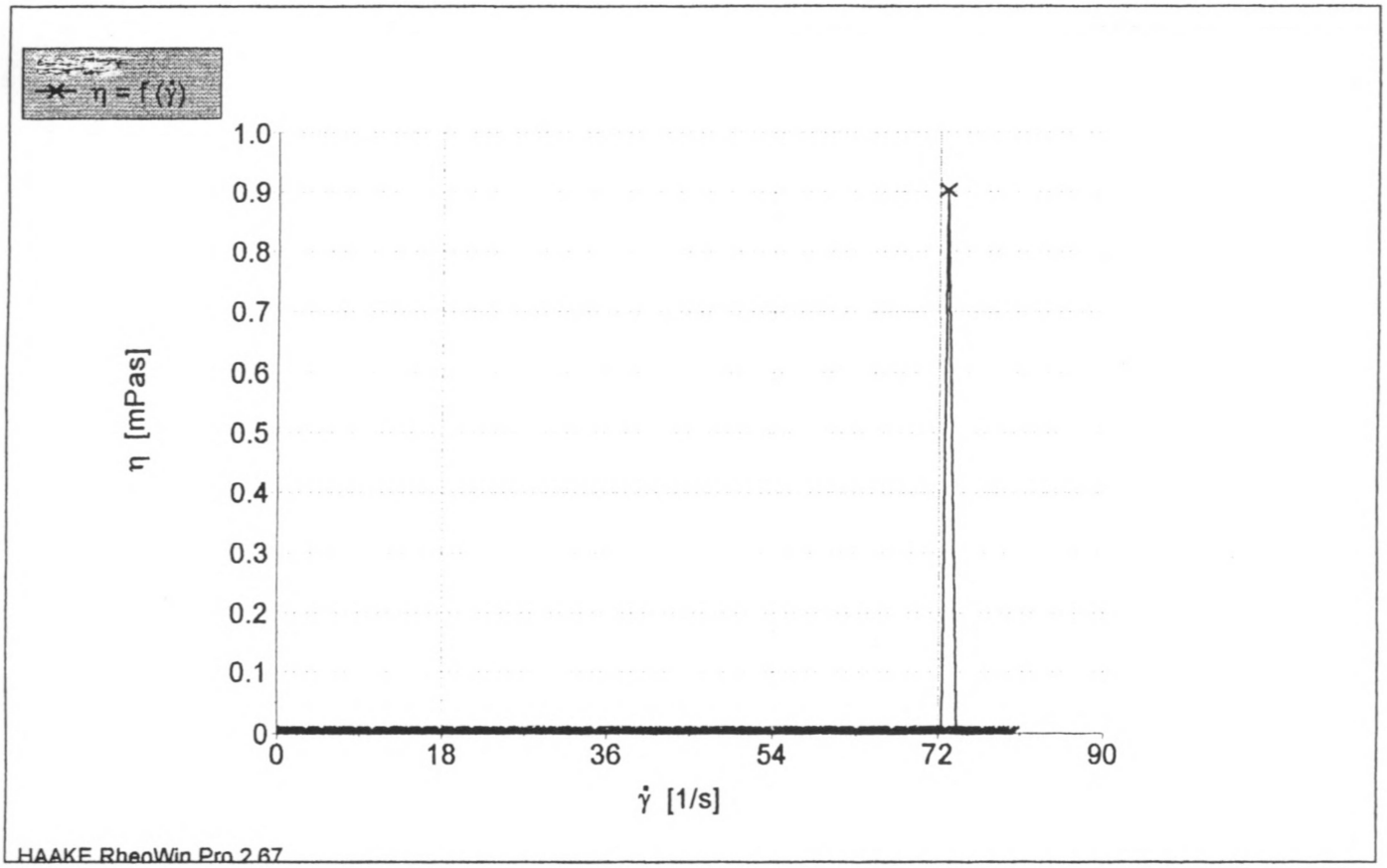
CR lin, prev 1/s - 80.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

CR , prev 1/s, t 30.00 s, #100, T prev °C

CR lin, prev 1/s - 0.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

Companhia	UNIVALI	**Dispositivo de medi**	VT550		
Operador	UNIVALI	**Dispositivo de term**	DC30		
Data/Tempo	25.05.2001 / 09:33:27	**Sensor**	MV 1	**Fenda**	1.000 mm
Substância	.	**Fator A**	6570.000 Pa/Nm		
Amostra No.	1	**Fator-M**	22.350 1/s/(rad/s)		
Descrição	pept 0,1g				

Comentário



Nome do arquivo: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Data\sandro.rwd

Trabalho: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Jobs\polimeros.rwj

Definição de elementos / Notas	**Avaliação**

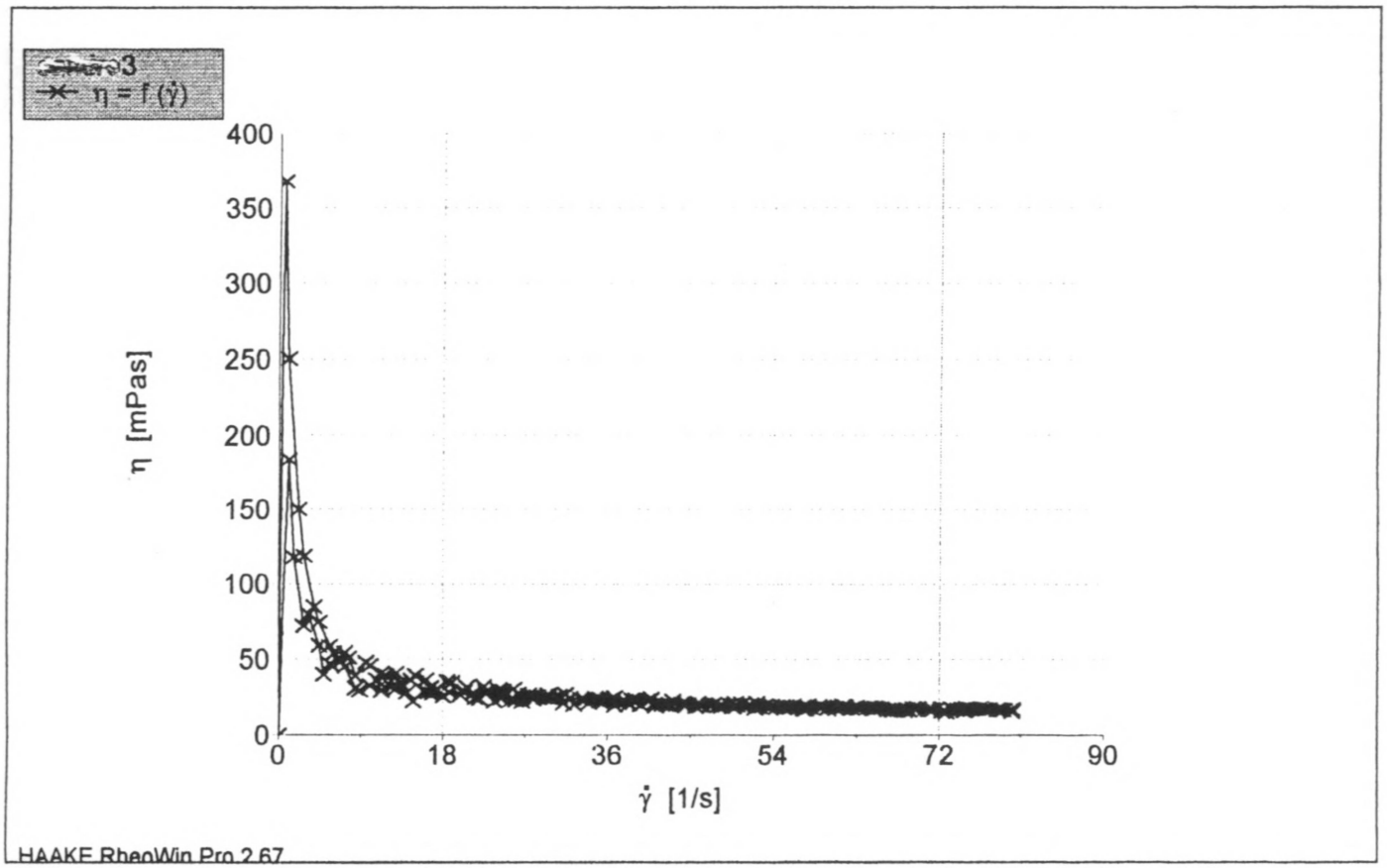
CR lin, prev 1/s - 80.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

CR , prev 1/s, t 30.00 s, #100, T prev °C

CR lin, prev 1/s - 0.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

Companhia	UNIVALI	**Dispositivo de medi**	VT550		
Operador	UNIVALI	**Dispositivo de term**	DC30		
Data/Tempo	25.05.2001 / 10:11:19	**Sensor**	MV 1	**Fenda**	1.000 mm
Substância		**Fator A**	6570.000 Pa/Nm		
Amostra No.	3	**Fator-M**	22.350 1/s/(rad/s)		
Descrição	nit				

Comentário



Nome do arquivo: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Data\sandro3.rwd

Trabalho: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Jobs\polímeros.rwj

Definição de elementos / Notas	**Avaliação**

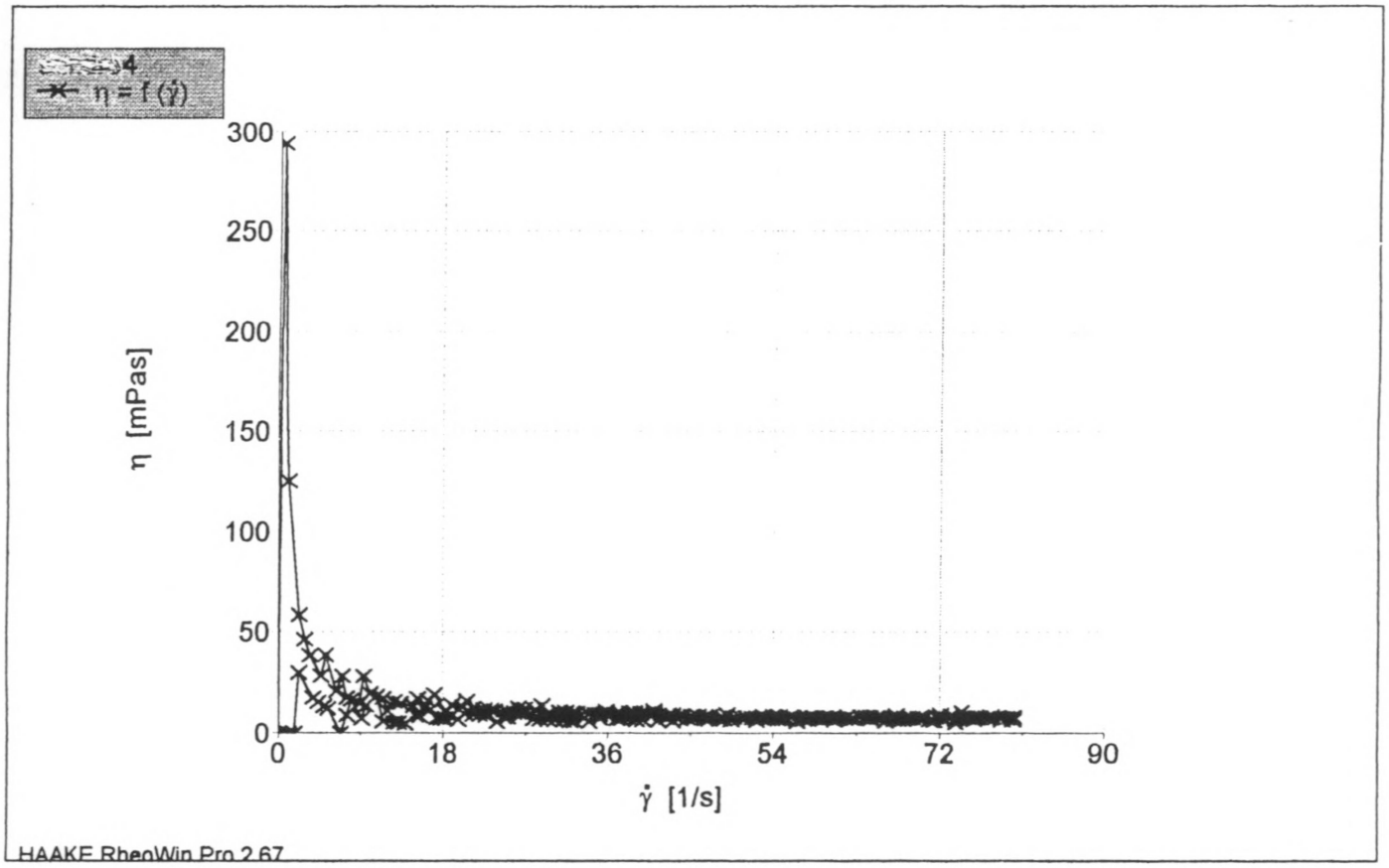
CR lin, prev 1/s - 80.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

CR , prev 1/s, t 30.00 s, #100, T prev °C

CR lin, prev 1/s - 0.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

Companhia	UNIVALI	**Dispositivo de medi**	VT550		
Operador	UNIVALI	**Dispositivo de term**	DC30		
Data/Tempo	25.05.2001 / 10:21:15	**Sensor**	MV 1	**Fenda**	1.000 mm
Substância		**Fator A**	6570.000 Pa/Nm		
Amostra No.	4	**Fator-M**	22.350 1/s/(rad/s)		
Descrição	sulf				

Comentário



Nome do arquivo: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Data\sandro4.rwd

Trabalho: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Jobs\polímeros.rwj

Definição de elementos / Notas

Avaliação

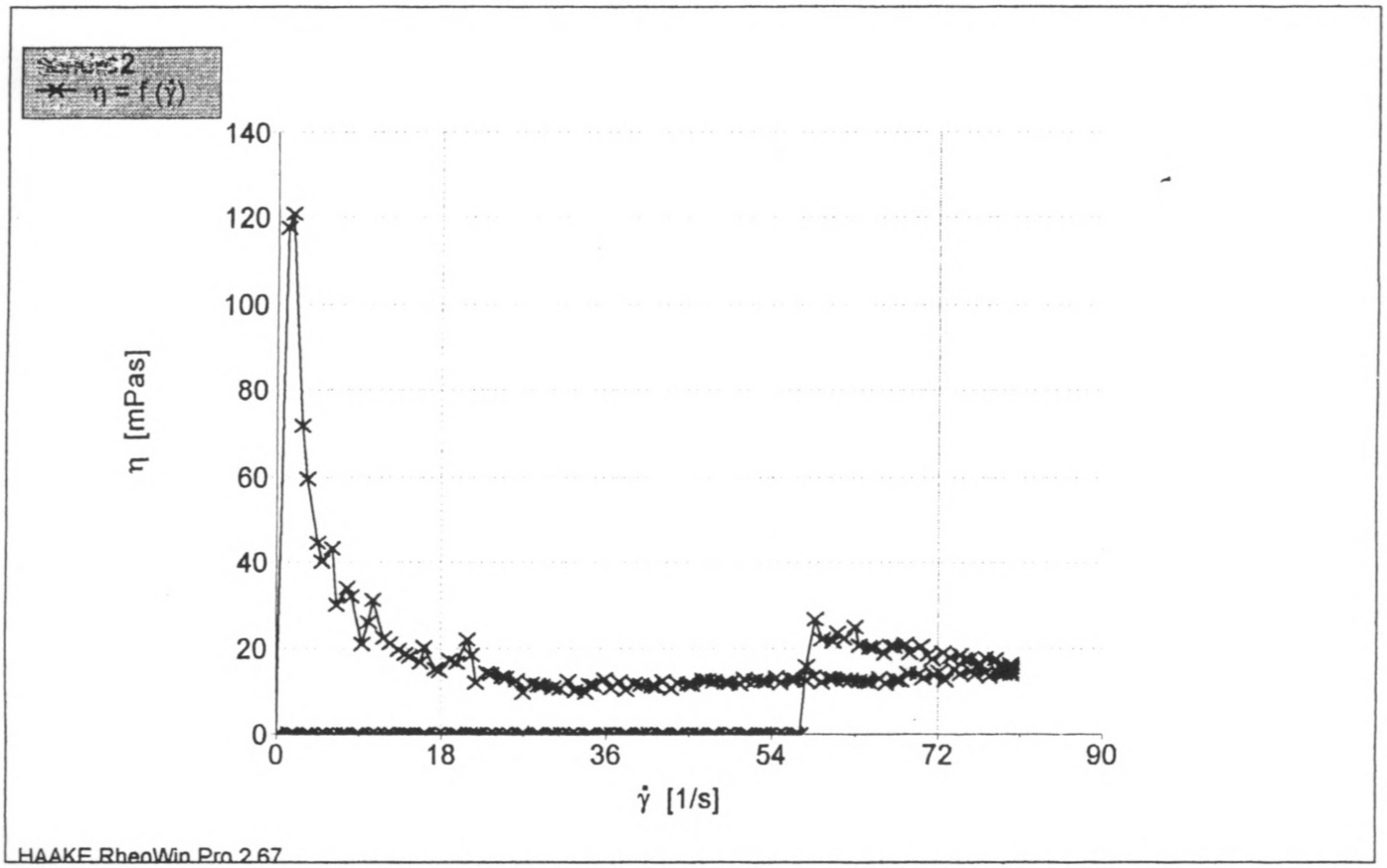
CR lin, prev 1/s - 80.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

CR , prev 1/s, t 30.00 s, #100, T prev °C

CR lin, prev 1/s - 0.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

Companhia	UNIVALI	**Dispositivo de medi**	VT550		
Operador	UNIVALI	**Dispositivo de term**	DC30		
Data/Tempo	25.05.2001 / 09:50:40	**Sensor**	MV 1	**Fenda**	1.000 mm
Substância		**Fator A**	6570.000 Pa/Nm		
Amostra No.	2	**Fator-M**	22.350 1/s/(rad/s)		
Descrição	ureia 0,1g				

Comentário



Nome do arquivo: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Data\sandro2.rwd

Trabalho: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Jobs\polimeros.rwj

Definição de elementos / Notas	Avaliação

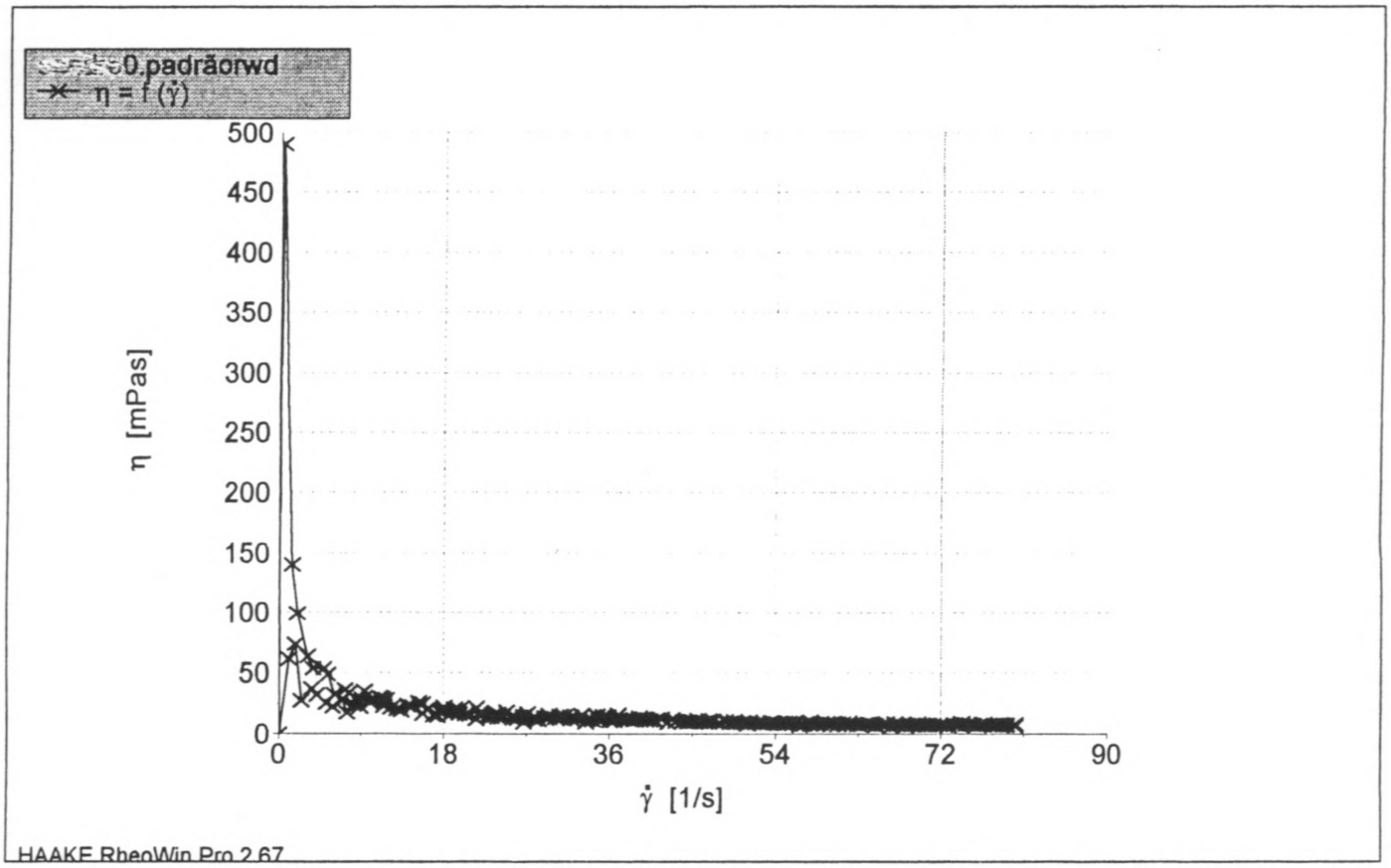
CR lin, prev 1/s - 80.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

CR , prev 1/s, t 30.00 s, #100, T prev °C

CR lin, prev 1/s - 0.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

Companhia	UNIVALI	**Dispositivo de medi**	VT550		
Operador	UNIVALI	**Dispositivo de term**	DC30		
Data/Tempo	04.06.2001 / 14:16:29	**Sensor**	MV 1	**Fenda**	1.000 mm
Substância		**Fator A**	6570.000 Pa/Nm		
Amostra No.	AM1	**Fator-M**	22.350 1/s/(rad/s)		
Descrição	amostra 0306				

Comentário



Nome do arquivo: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Data\sandro0.padrãorwd.rwd

Trabalho: C:\Arquivos de programas\RheoWin\Jobs\polímeros.rwj

Definição de elementos / Notas

CR lin, prev 1/s - 80.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

CR , prev 1/s, t 30.00 s, #100, T prev °C

CR lin, prev 1/s - 0.00 1/s, t 180.00 s, #100, T prev °C

Avaliação

Tixotropia:

Diff. -3.763 [Pa1/s], A(1)= 31.77 [Pa1/s], A(2)= 0 [Pa1/s], A(3)= 35.53 [Pa1/s];

ANEXO 2

ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DAS GOMAS XANTANAS PRODUZIDAS COM AS FONTES ALTERNATIVAS DE NITROGÊNIO

File # 3 : 285QUEL

Mode= 2 (Mid-IR)

09/07/2000 23:04

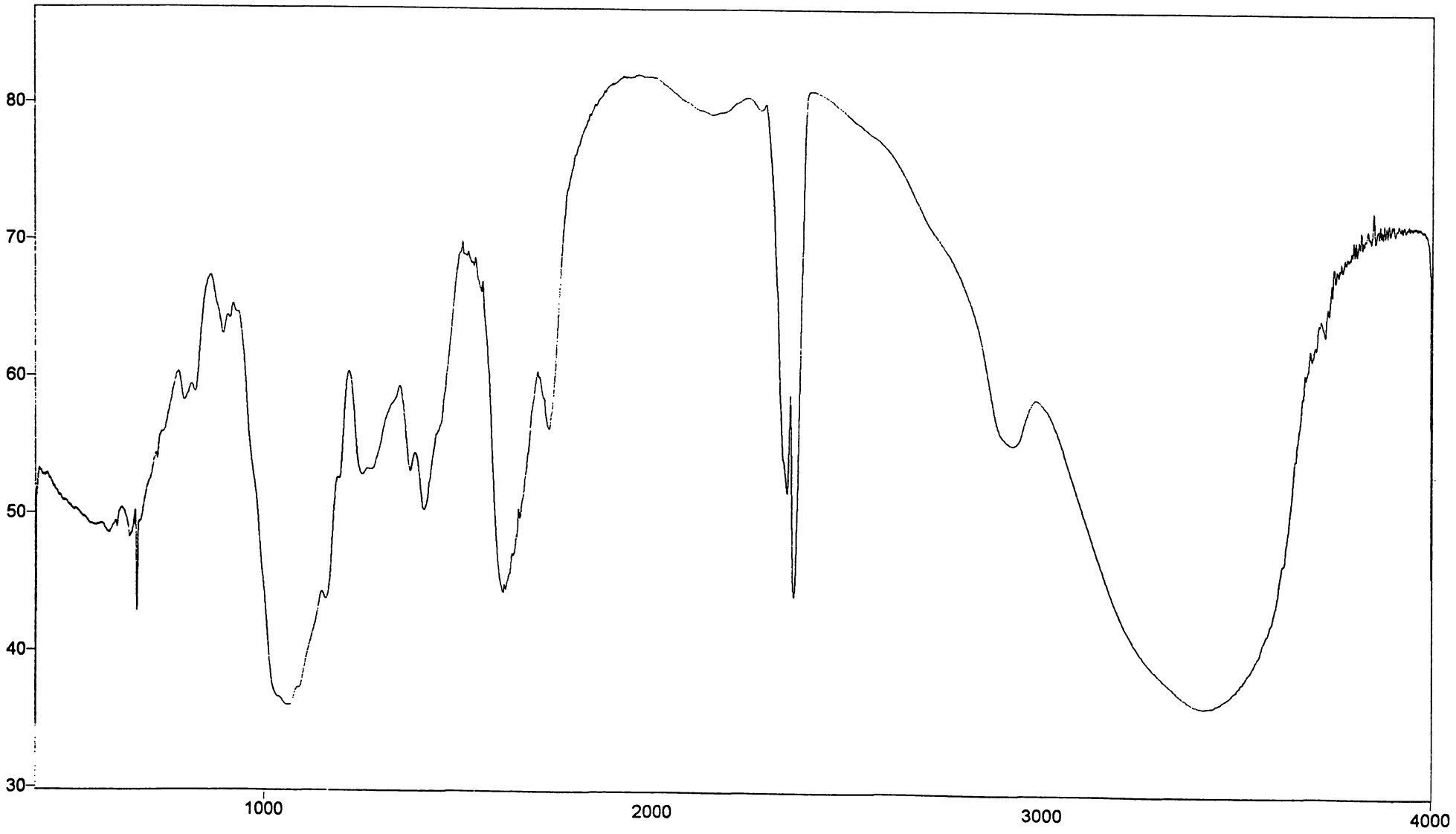
Sample Description:

Scans= 20 Slow

Res=2 cm-1

Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 3 : 285QPEPT

Mode= 2 (Mid-IR)

09/07/2000 23:49

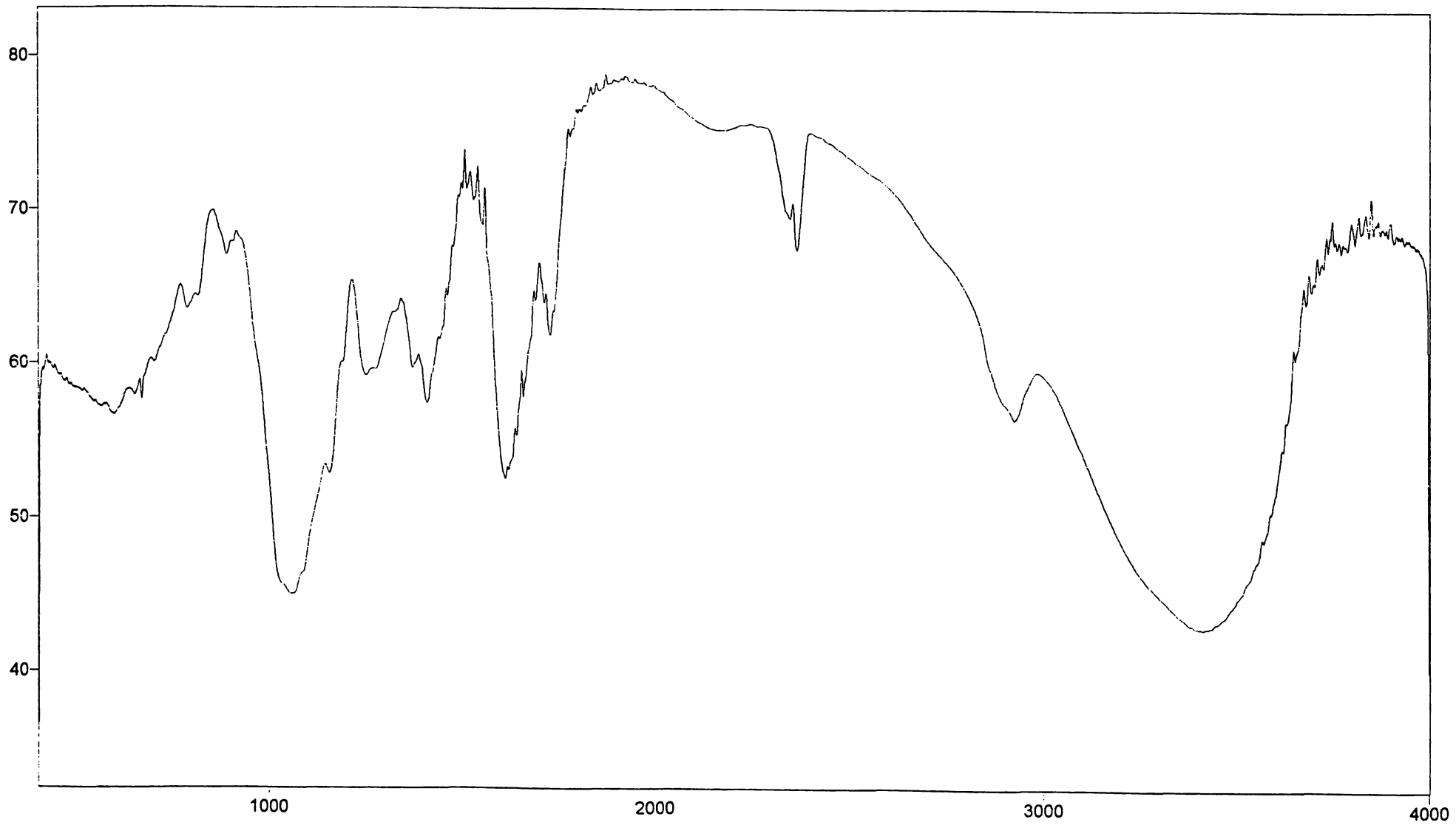
ple Description:

ns= 20 Slow

Res=2 cm-1

Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 3 : 285QUNIT

Mode= 2 (Mid-IR)

09/07/2000 23:13

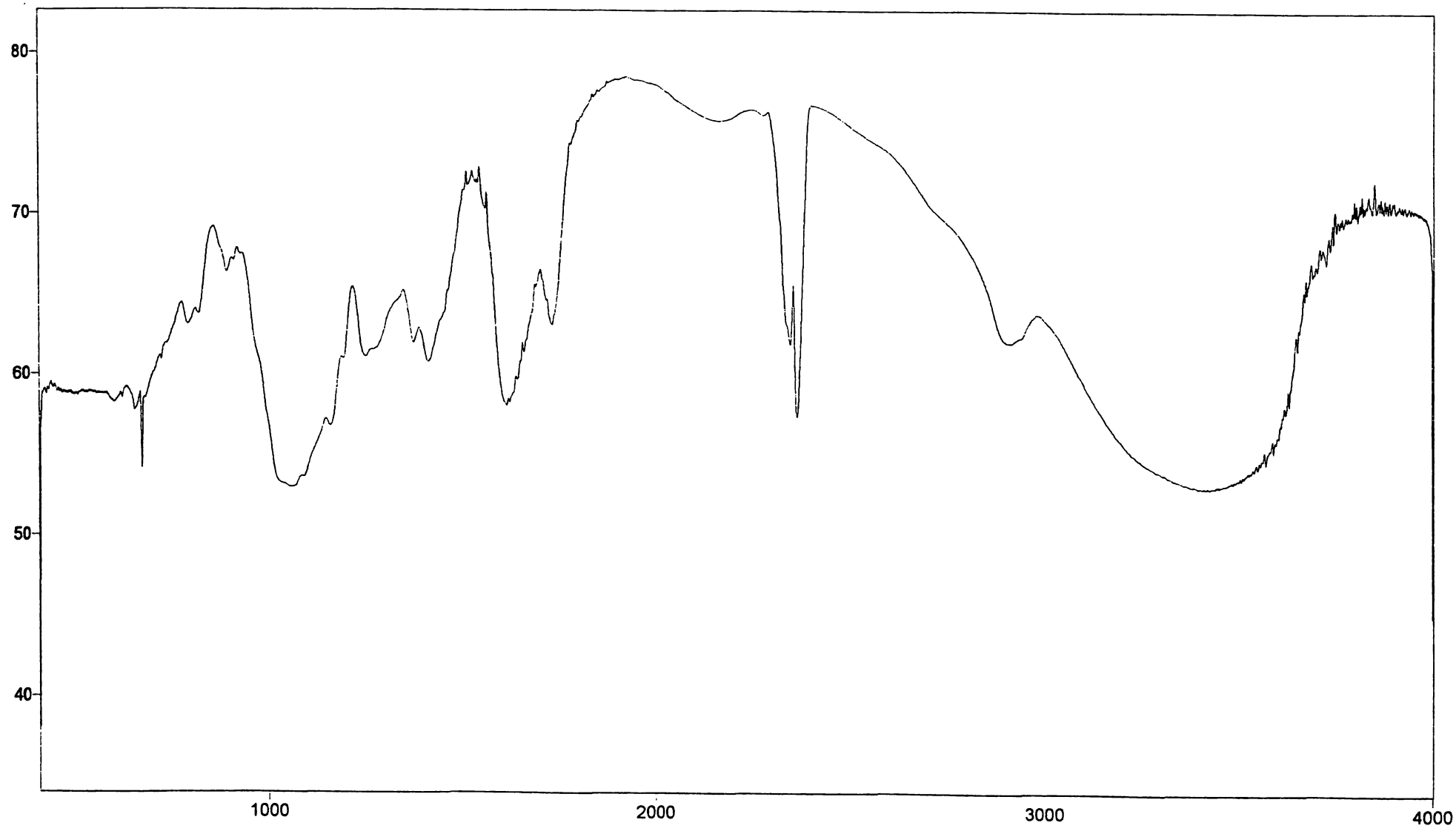
nple Description:

...s= 20 Slow

Res=2 cm-1

Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 3 : 235QSULF

Mode= 2 (Mid-IR)

09/07/2000 23:21

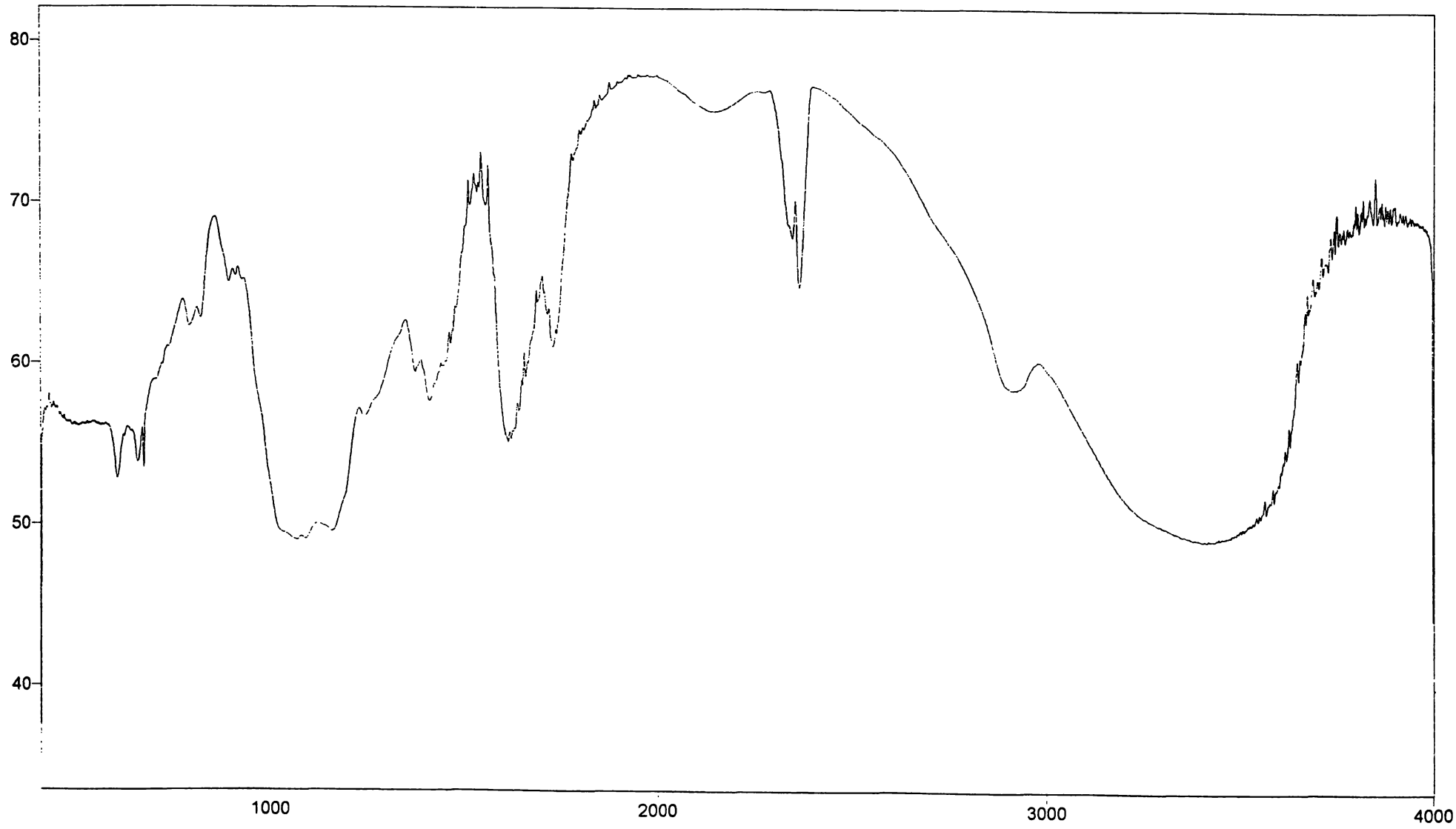
Sample Description:

Scans= 20 Slow

Res=2 cm-1

Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 3 : 285QURE

Mode= 2 (Mid-IR)

09/07/2000 23:35

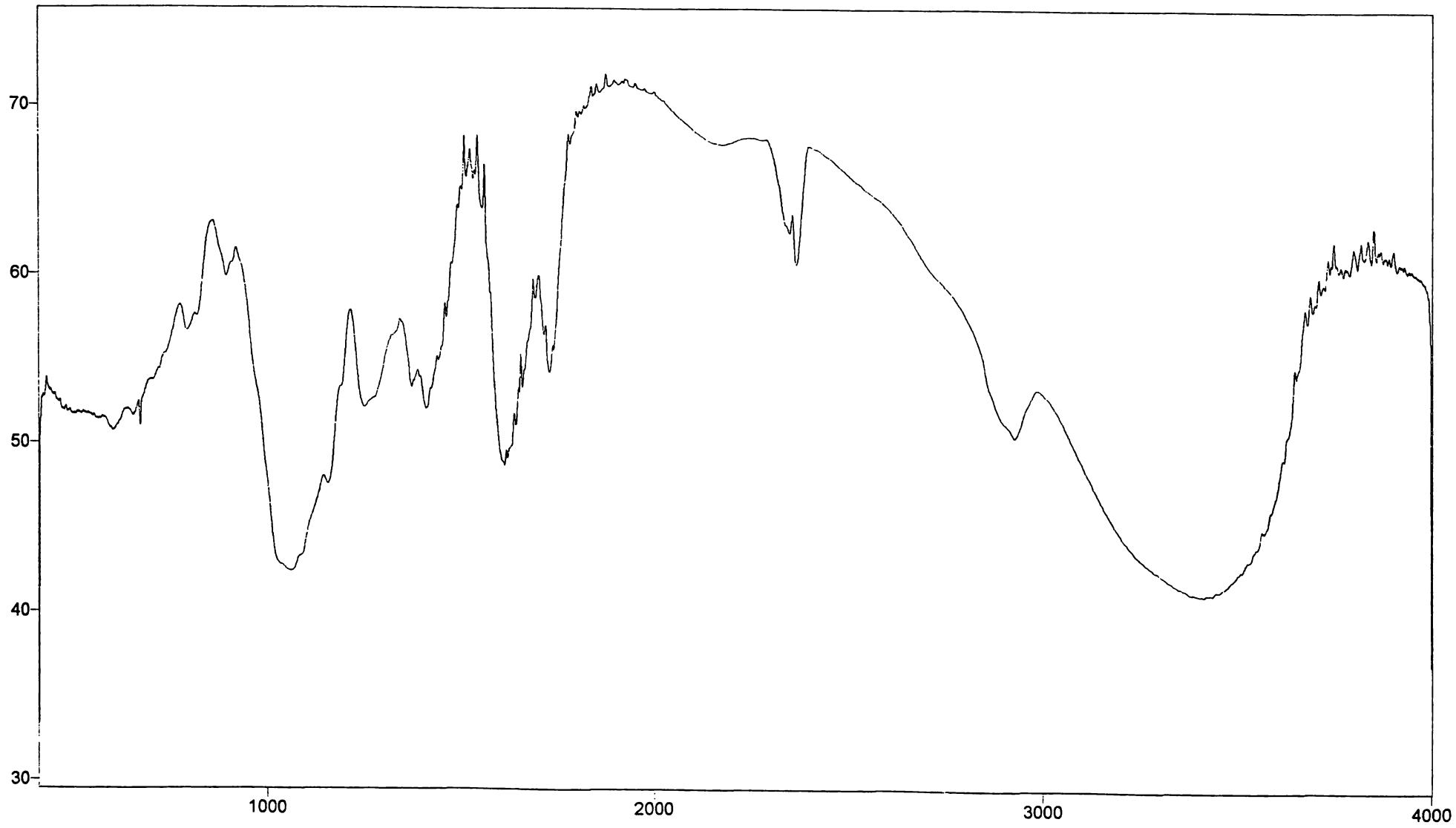
Sample Description:

ns= 20 Slow

Res=2 cm-1

Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x

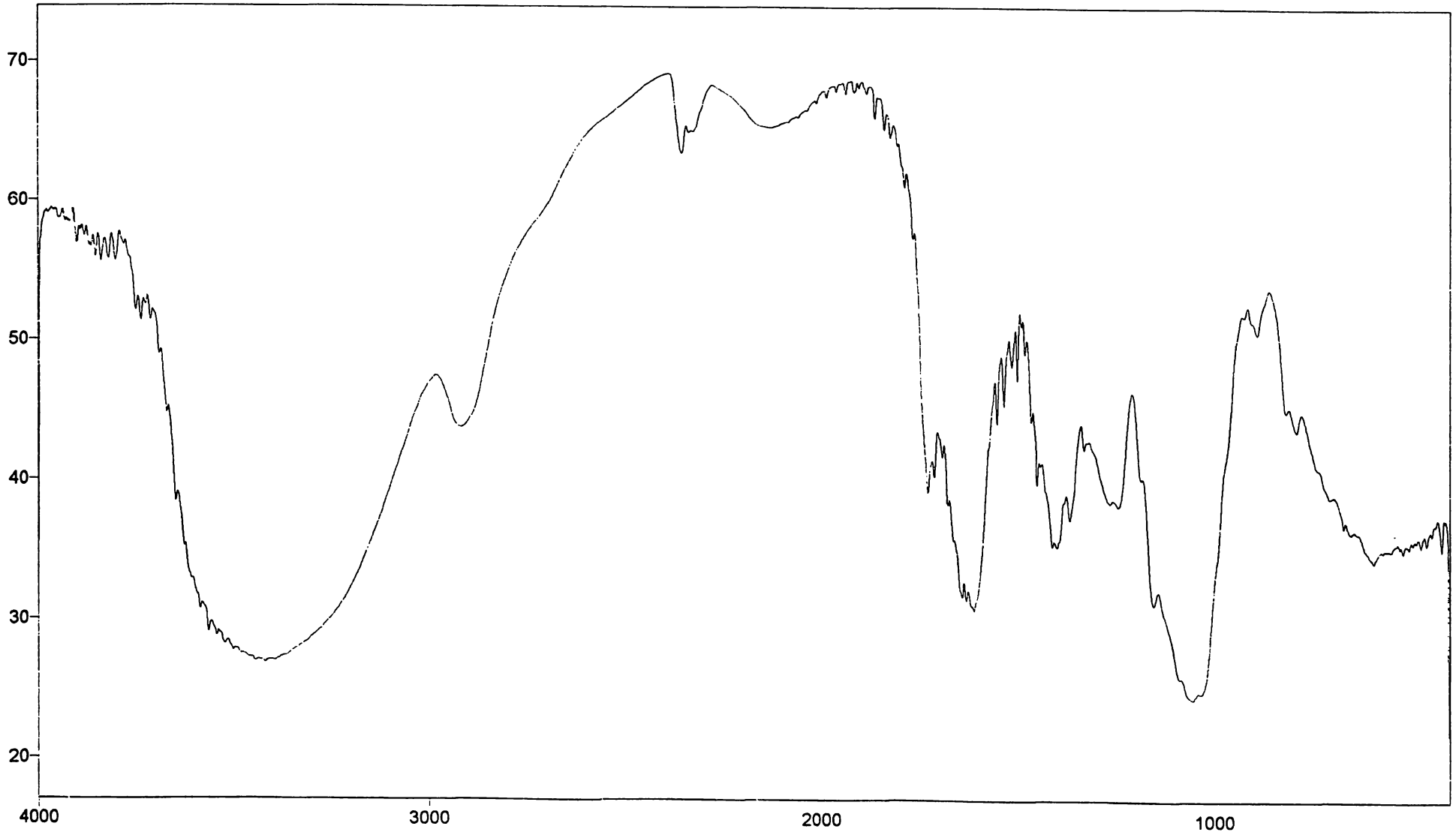


Transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 3 : PADRAOP | Mode= 2 (Mid-IR) | 10/07/2000 12:43

Sample Description:

Scans= 20 Slow | Res=2 cm-1 | Apod= Cosine | Zero Filling= 1 x



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

ANEXO 3

ANÁLISE DE NITRATO NA GOMA XANTANA PRODUZIDA COM NITRATO DE POTÁSSIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR DE TECNOLOGIA

CEPPA

CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

CENTRO POLITÉCNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA PP01
CX. P. 19.083 - FONES: (041) 366-3668 / 361-3195 - FAX: (041) 266-1647
e-mail ceppa@bsi.com.br - CEP 81531-970 - CURITIBA - PARANÁ

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 35950

PRODUTO: SOLUÇÃO DE GOMA XANTANA
FABRICANTE/PRODUTOR: --- x ---
SOLICITANTE: Adenise Lorenci Woiciechowski
ENDEREÇO: Centro Politécnico Lab. Processos Biotecnológico - Curitiba/PR
PROTOCOLO DE RECEPÇÃO DE AMOSTRA Nº 2752 - 07/11/01
AMOSTRA Nº 8347/01

RESULTADOS

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Nitrato..... < 1,00 mg NO_3^--N/L

METODOLOGIA
STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington: APHA; AWWA; WEF. 1998.

Wilton Fontes Ramos
CRQ 09401062

/j

Curitiba, 08 de novembro de 2001.

Cristina Mara Guolo Winter
CRF 5891 PR

Prof. Gabriel Adolfo Ribeiro Guimarães
DIRETOR EXECUTIVO

OBSERVAÇÃO: A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA.