UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAOPEBA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Aplicação da metodologia de superfície de resposta, modelos cinéticos e transformada Z na produção de biopolímeros a partir de substratos alternativos

MARIA RITA MEYER FERRAZ DA COSTA

OURO BRANCO - MG

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAOPEBA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Aplicação da metodologia de superfície de resposta, modelos cinéticos e transformada Z na produção de biopolímeros a partir de substratos alternativos

Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de São João del-Rei como requisito para a obtenção de título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson Romano Nucci

Co-Orientador: Prof. Dr. Juan Canellas Bosch Neto

OURO BRANCO – MG

2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã por todo o amor, carinho, compreensão e apoio que vocês sempre me deram.

Ao meu orientador Edson Romano Nucci por todo o suporte, amizade, orientação e confiança dados durante a graduação e o mestrado.

Ao meu co-orientador Juan Canellas Bosch Neto por toda a dedicação, auxílio e as inúmeras ideias dadas ao projeto.

Ao Eder por toda a paciência, companheirismo e suporte no laboratório até nos finais de semana e feriados.

A primeira turma do PPGEQ, Cassia, Priscila, Dani, Vitor, Jeneíne, Aline, Vitor e Jamilly.

Aos professores do PPGEQ e a Cínthya, por toda ajuda e ensinamentos compartilhados.

À turma do laboratório biotecnológico, Priscila, Ana Carolina, Mayara, Bruna, Xênia, Katialaine e Vinícius pela amizade, diversão e companheirismo durante esses dois anos e pelas divertidas horas do café.

Aos técnicos, Wesley, Gicele e Paula, por toda a ajuda, suporte e ensinamento.

Aos professores Telles Timóteo da Silva e Alexandre Celestino Leite Almeida pelo suporte, confiança e ensinamento compartilhados durante o projeto desenvolvido.

Ao professor Enio Nazaré de Oliveira Júnior pelo suporte, confiança, dedicação e ensinamento compartilhado durante o projeto que desenvolvemos.

Ao professor Vagner Fernandes Knupp pela confiança e ensinamento compartilhado durante o projeto desenvolvido.

As professoras Sandra Dias e Isabel Braga pela colaboração em ceder os equipamentos.

A todos os professores da graduação de engenharia de bioprocessos pelo suporte e ensinamentos.

Ao PPGTDS pela colaboração em utilizar o laboratório de fermentações e o viscosímetro.

A agência financiadora FAPEMIG pelo suporte financeiro para este projeto.

Aos professores da banca André Aguiar e Igor Boggione pela disponibilidade e pelo enriquecimento deste trabalho.

A Maíra Paola Ferreira pela ajuda nas simulações.

Ao Miguel, funcionários, estudantes e colegas do CAP que sempre me deram suporte e me proporcionaram bons momentos no campus.

A todos os meus amigos e as pessoas que me ajudaram neste trabalho, sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido. Obrigada à todos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do polímero goma xantana produzido por *X. campestris* (modificado de Brandão, 2012).....6
Figura 2. *Xanthomonas campestris*. A) Micrografia eletrônica de transmissão (x 12.000); B) Aspectos do crescimento de *X. campestris* em meio YM (Ramos, 2011).....8
Figura 3. Folha de couve infectada pela bactéria *X. campestris* (modificado de García-Ochoa *et al.*, 2000).....9
Figura 4. Processo de produção da goma xantana (Brandão, 2012).....12
Figura 5. (a) Constituição morfológica da cana-de-açúcar, (b) localização do parênquima no colmo; (c) cana-de-açúcar (Ernesto, 2009).....19
Figura 6. Representação da cepa da bactéria *X. campestris* utilizada para este trabalho (lente de aumento de 40x) (Fonte: Arquivo pessoal).....29
Figura 7. Leite de mandioca preparado para ser utilizado como substrato alternativo (Fonte: arquivo pessoal).....30
Figura 8. Experimento para produção de goma xantana utilizando bagaço de cana-de-açúcar utilizando biorreator Coluna de Bolhas (Fonte: Arquivo pessoal).....35
Figura 9. Comportamento reológico da goma xantana produzida pelo meio alternativo soro de leite com concentração de 0,5% (m/v) submetidas as temperaturas de 25, 35, 45, 55, 65, 75 e 85°C (Costa, 2014).....44
Figura 10. Comportamento reológico da goma xantana produzida pelos meio padrão e meios alternativos com concentração de 0,05% (m/v) submetidas as velocidades de rotação de 10, 20, 30, 50, 60 e 100 rpm.....45
Figura 11. Comparação entre as gomas xantanas (a) leite de mandioca e (b) sacarose (Fonte: arquivo pessoal).....48
Figura 12. Superfície de resposta com o comportamento do rendimento da goma xantana em relação à concentração de leite de mandioca e inóculo.....49
Figura 13. Diagrama de Pareto com o comportamento da produção de goma xantana pela cepa 13951.....52
Figura 14. Superfície de resposta com o comportamento do rendimento da goma xantana em relação à concentração do volume de leite de mandioca e de inóculo.....53

Figura 15. Superfície de resposta com o comportamento da viscosidade aparente da goma xantana em relação à concentração do volume de leite de mandioca e de inóculo.....54
Figura 16. Diagrama de Pareto com o comportamento da viscosidade de goma xantana em relação ao volume de leite de mandioca e inóculo.....55
Figura 17. Diagrama de Pareto com o comportamento da produtividade de goma xantana em relação ao volume de leite de mandioca e inóculo.....57
Figura 18. Superfície de resposta com o comportamento da produtividade da goma xantana em relação à concentração do volume de leite de mandioca e de inóculo.....58
Figura 19. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável rendimento da produção de goma xantana utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo.....61
Figura 20. Superfície de resposta da variável rendimento da goma xantana em relação à concentração do bagaço de cana-de-açúcar e de volume de inóculo.....62
Figura 21. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável viscosidade da solução de goma xantana a concentração de 5,0% (m/v) pela cepa 13951.....63
Figura 22. Superfície de resposta da variável viscosidade com rotação de 0,5 rpm da solução de goma xantana em relação à concentração do bagaço de cana-de-açúcar e de volume de inóculo.....64
Figura 23. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável produtividade da solução de goma xantana pela cepa 13951.....65
Figura 24. Superfície de resposta da variável produtividade da goma xantana em relação à concentração do bagaço de cana-de-açúcar e de volume de inóculo.....67
Figura 25. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável rendimento da produção de goma xantana pela cepa 13951.....70
Figura 26. Superfície de resposta da variável rendimento da goma xantana em relação à concentração de biomassa de malte e de volume de inóculo.....71
Figura 27. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável viscosidade da produção de goma xantana pela cepa 13951.....72
Figura 28. Superfície de resposta da variável viscosidade da goma xantana em relação à concentração de biomassa de malte e de volume de inóculo.....73
Figura 29. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável produtividade da solução de goma xantana pela cepa 13951.....74

Figura 30. Superfície de resposta da variável produtividade da goma xantana em relação à concentração de biomassa de malte e de volume de inóculo.....75
Figura 31. Modelagem do sistema discreto em regime batelada via equação plano de estado.....79
Figura 32. Modelagem do sistema discreto via equação plano de estado em regime contínuo.....80
Figura 33. Cinética das concentrações de biomassa (*Cx*), substrato (*Cs*) e produto (*Cp*) ao longo do tempo obtido pelo experimento.....81
Figura 34. Simulação utilizando biorreator contínuo utilizando modelo cinético de Verhulst.....84
Figura 35. Modelagem de biorreator em batelada empregando os modelos de Monod, Verhulst e dos dados experimentais obtidos com a cinética de produção do polissacarídeo, (a) com tempo de fermentação de 25 horas e (b) com tempo de 10 horas.....85
Figura 36. Modelagem do modelo cinético de Verhulst utilizando biorreator em batelada e biorreator contínuo.....87
Figura 37. Layout do programa utilizado com os parâmetros a serem controlados.....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização físico-química dos meios alternativos leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte antes e após as 120 horas de fermentação para a produção de goma xantana.....41
Tabela 2. Planejamento experimental variando porcentagem de inóculo (%v/v), porcentagem de leite de mandioca (% v/v) e os rendimentos obtidos.....47
Tabela 3. Valores dos rendimentos ($g.L^{-1}$) e das viscosidades (cP) das diluições dos leites de mandioca, amarela e branca.....50
Tabela 4. Planejamento experimental variando porcentagem de inóculo (% v/v) e porcentagem de leite de mandioca (% v/v), rendimento ($g.L^{-1}$), viscosidade (cP) a 1 rpm e produtividade ($cP.L.g.^{-1}$).....51
Tabela 5. Valores da ANOVA para o rendimento da goma xantana pela cepa 13951....52
Tabela 6. Valores da ANOVA para a viscosidade aparente da goma xantana pela cepa 13951 em relação à concentração do volume de leite de mandioca e inóculo.....56
Tabela 7. Valores da ANOVA para a produtividade aparente da goma xantana pela cepa 13951 em relação à concentração do volume de leite de mandioca e inóculo.....57
Tabela 8. Planejamento experimental utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de biopolímero, resultados obtidos das variáveis rendimento ($g.L^{-1}$), viscosidade (cP) a 5 rpm e produtividade do experimento ($cP.L.g^{-1}$).....60
Tabela 9. Valores da ANOVA para o rendimento da goma xantana pela cepa 13951....61
Tabela 10. Valores da ANOVA para a variável viscosidade da goma xantana pela cepa 13951.....63
Tabela 11. Valores da ANOVA para a variável produtividade da goma xantana pela cepa 13951.....66
Tabela 12. Planejamento experimental utilizando biomassa de malte para a produção de bimassa de malte, resultados obtidos das variáveis rendimento ($g.L^{-1}$), viscosidade (cP) a 20 rpm e produtividade do experimento ($cP.L.g^{-1}$).....69
Tabela 13. Valores da ANOVA para o rendimento da goma xantana a partir de biomassa de malte.....70
Tabela 14. Valores da ANOVA para a variável viscosidade da goma xantana pela cepa 13951.....72
Tabela 15. Valores da ANOVA para a variável produtividade da goma xantana pela cepa 13951.....75

Tabela 16. Valores de rendimento, viscosidade e produtividade dos substratos padrão e alternativos.....77
Tabela 17. Dados obtidos da cinética das concentrações de biomassa (*Cx*), substrato (*Cs*) e produto (*Cp*) ao longo do tempo do experimento.....81
Tabela 18. Parâmetros obtidos e ajustados dos modelos cinéticos propostos.....82
Tabela 19. Valores dos rendimentos e da análise de reologia obtidos na produção de goma xantana utilizando bagaço de cana-de-açúcar em biorreator Coluna de Bolhas....88

LISTA DE ANEXOS

Anexo I – Curva padrão da dosagem de proteínas totais pelo Método de Lowry

Anexo II – Curva de contorno dos experimentos utilizando os substratos alternativos

RESUMO

A goma xantana é um polissacarídeo produzido por bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas.* Essa goma tem grande importância comercial e é um polímero muito utilizado em alimentos no Brasil e no mundo desde 1969, para utilização como estabilizante, emulsificante e espessante em alimentos. É amplamente utilizada devido às suas características reológicas, como capacidade de alterar as propriedades básicas da água, além de possuir alta viscosidade em baixas concentrações, estabilidade em uma ampla faixa de temperatura, pH e concentração de sais. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar o rendimento, a viscosidade e a produtividade na produção de goma xantana pela bactéria *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 utilizando como substratos alternativos o leite de mandioca, o bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte sob diferentes condições de concentração do substrato e volume de inóculo. Os resultados foram comparados com a goma xantana produzida a partir de meio padrão de sacarose. Foi utilizada a técnica do planejamento de experimento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para avaliar os efeitos das variáveis na produção da goma xantana. Por meio dos resultados foi possível observar que o rendimento médio para a produção da goma xantana utilizando o leite de mandioca foi de 2,81 $g.L^{-1}$, 1,03 $g.L^{-}1$ para o bagaço de cana-de-açúcar e 0,71 $g.L^{-1}$ para a biomassa de malte. Enquanto a sacarose apresentou, 0,19 $g.L^{-1}$. Esses resultados indicam que é possível produzir goma xantana a partir dos meios alternativos analisados, porém a sacarose promove maior viscosidade e consequentemente, produtividade em goma xantana. Por meio da modelagem utilizando os modelos cinéticos de Monod e Verhulst foi possível determinar os parâmetros de $\mu_{máx}$ (0,49 h^{-1}), Yx/s (3,35 g_{cel}/g_{sac}), Yx/p (14,00 g_{cel}/g_{xant}) e Yp/s (0,239 g_{xant}/g_{sac}) utilizando como substrato alternativo o bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados utilizando o modelo de Monod indicam que este modelo se ajusta somente até 4 h de cultivo. Entretanto, utilizando o modelo de Verhulst observa-se um ajuste válido em todo o cultivo. Em relação à Transformada Z, os resultados indicam que esta metodologia pode ser utilizada na produção de goma xantana mesmo considerando este sistema sendo discreto ao invés de contínuo como utilizados nas técnicas padrões em Bioprocessos.

PALAVRAS-CHAVE: substratos alternativos, biopolímero, goma xantana, modelagem, transformada Z, modelos cinéticos.

ABSTRACT

The xanthan gum is a polysaccharide produced by gram-negative bacteria from generous *Xanthomonas*. This gum has commercial importance and is the most used polymer in food in Brazil and in the world since 1969, to be used as stabilizer, emulsifier and thickener in foods. Is largely used due from their reology characteristics such as capacity to change the basics properties from the water, beyond to keep high viscosity in lower concentrations, stability in a wide range of temperature, pH and salt concentration. Thus, the objective of this study was to available the yield, viscosity and productive in a xanthan gum production for the bacteria *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 using as alternative substrates the cassava milk, sugarcane bagasse and malt biomass under different conditions of substrates concentrations and the volume of inoculum. The results were compared with the xanthan gum produced starting the means standard sucrose. The technique used was the Experimental Design of Rotatable Central Composite Design (CCD) to available the effects of variables in the production of xanthan gum. Through the results it was possible to observe that the medium yield to the production of xanthan gum using the cassava milk was 2,81 $g.L^{-1}$, 1,03 $g.L^{-1}$ to the sugarcane bagasse and 0,71 $g.L^{-1}$ to the malt biomass. While the sucrose presented, 0,19 $g.L^{-1}$. These results indicate that is possible to produce xanthan gum with alternative means analised, however the sucrose promotes higher viscosity and consequently, productivity in xanthan. Through the modeling using the kinetic models from Monod and Verhulst it was possible to determine the parameters $\mu_{máx}$ (0,49 h^{-1}), Yx/s (3,35 g_{cel}/g_{sac}), Yx/p (14,00 g_{cel}/g_{xant}) e Yp/s (0,239 g_{xant}/g_{sac}) using as alternative substrates the sugarcane bagasse. The results using the Monod model indicates that this model fits only for 4 hours of culture. However, using the Verhulst model observes that a valid setting in all cultivation. For the Z transform, the results indicates that this methodology could be used in the production of xanthan gum equal considering this system being used discrete instead of continuous time as used in standard techniques in bioprocess.

Keywords: alternative substrates, biopolymer, xanthan gum, modeling, Z transform, kinetics models.

SUMÁRIO

1. Introdução 1

2. Objetivos.....3

2.1 Objetivos específicos.....3

3. Revisão Bibliográfica.....4

3.1 Biopolímeros.....4

3.2 Goma xantana.....5

3.3 Bactéria *Xanthomonas campestris*.....8

3.4 Processo fermentativo para obtenção da goma xantana.....10

3.5 Viscosidade aparente 13

3.6 Aplicações da goma xantana.....14

3.7 Meio de cultura para a produção de goma xantana 16

3.8 Meio padrão- Sacarose.....16

3.9 Substratos alternativos 17

3.9.1 Leite de mandioca.....17

3.9.2 Bagaço de cana-de-açúcar.....18

3.9.3 Biomassa de malte 20

3.10 Planejamento experimental 21

3.11 Transformada Z 23

3.12 Modelos Cinéticos 24

3.12.1 Modelos cinéticos para o crescimento da bactéria propostos na literatura 26

3.12.2 Modelo cinético utilizado neste trabalho 28

3.13 Considerações finais 28

4. Materiais e métodos.....29

4.1 Obtenção e Manutenção da bactéria *Xanthomonas campestris* 29

4.1.1 Obtenção da cepa da bactéria 29

4.1.2 Manutenção da bactéria.....29

4.2 Preparo dos meios alternativos.....30

4.2.1 Leite de mandioca.....30

4.2.3 Bagaço de cana-de-açúcar.....30

4.2.3 Biomassa de malte 31

4.3 Caracterização dos substratos alternativos 31

4.3.1 Teor de umidade 31

4.3.2 Teor de cinzas 31

4.3.3 Dosagem de proteínas totais 32
4.3.4 Lipídios totais 32
4.4 Produção de goma xantana em *shaker*.....33
4.4.1 Preparo do inóculo 33
4.4.2 Obtenção das variáveis e condições de produção de goma xantana 33
4.5 Produção de goma xantana em Biorreator 34
4.6 Precipitação da goma xantana 35
4.7 Preparo das soluções para análise no viscosímetro 36
4.7.1 Comportamento reológico 36
4.8 Transformada Z aplicada a um bioprocesso 36
4.9 Modelo Cinético aplicado a um bioprocesso 38
5 Resultados e Discussão 41
5.1 Caracterização dos meios alternativos 41
5.2 Preparo das soluções para análise no viscosímetro 43
5.2.1 Comportamento reológico 43
5.3 Processo de produção da goma xantana.....46
5.3.1 Leite de mandioca.....46
5.3.2 Bagaço de cana-de-açúcar.....59
5.3.3 Biomassa de Malte 68
5.3.4 Meio de cultura utilizando Sacarose 76
5.4 Resultados da modelagem utilizando a Transformada Z 78
5.5. Resultados utilizando os Modelos cinéticos 80
5.5.1 Modelagem de biorreator contínuo utilizando equação de Verhulst 83
5.5.2 Modelagem dos modelos cinéticos em biorreator batelada 84
5.6 Produção de goma xantana em biorreator Coluna de Bolhas 87
6. Conclusão 91
7. Trabalhos futuros.....92
8. Referências Bibliográficas.....93
9.1 Anexo I.....101
9.2 Anexo II 103

1. INTRODUÇÃO

As gomas são substâncias poliméricas capazes de formar dispersões, soluções altamente viscosas ou géis na presença de um solvente ou agente de inchamento apropriado, em baixas concentrações. Industrialmente, as gomas estão associadas aos polissacarídeos e seus derivados (Rodrigues *et al.*, 1993).

Até a década de 1950, os polissacarídeos utilizados no mercado internacional eram produzidos a partir de plantas. Desde então, surgiram os de origem microbiana, produzidos sob condições controladas de fermentação, o que os tornam mais estáveis e sem problemas ocasionados em relação às variações climáticas. Estes polissacarídeos podem ser usados como agentes espessantes, emulsificantes, gelificantes, floculantes e estabilizantes em indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e petrolífera (Rodrigues *et al*., 1993; Luvielmo e Scamparini, 2009).

A goma xantana é um polissacarídeo natural, também chamado de biopolímero, produzida por bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas* e possui estrutura primária formada por unidades repetidas de pentassacarídeos. Praticamente todas as bactérias desse gênero são fitopatogênicas e infectam grande variedade de plantas, dentre as quais podemos citar o algodão, a couve, o tomate, o pêssego e outras. Essa goma tem grande importância comercial, é atóxica e pode ser utilizada em alimentos. É o polímero mais utilizado em alimentos no Brasil e no mundo, com aprovação pelo *FDA* (Food and Drug Administration) desde 1969 para utilização como estabilizante, emulsificante e espessante em alimentos. É amplamente utilizada devido às suas características reológicas, como capacidade de alterar as propriedades básicas da água, além de possuir alta viscosidade em baixas concentrações, também apresenta estabilidade em uma ampla faixa de temperatura, pH e concentração de sais (Mothé e Correia, 2002; Luvielmo *et al.*, 2007; Borges e Vendruscolo, 2008; Nery *et al.*, 2008; Luvielmo e Scamparini, 2009).

O atual processo de produção da goma xantana consiste nas etapas de obtenção do pré-inóculo, inóculo, fermentação, pasteurização para a indústria alimentícia, remoção das células, precipitação, separação e secagem da goma. Muitos são os fatores que podem influenciar a produção desta, dentre os quais podemos citar o tipo de reator, o modo de operação, a composição do meio, e as condições da cultura como temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido (Luvielmo e Scamparini, 2009).

No Brasil há um crescente mercado de goma xantana e toda a demanda utilizada é importada. Por isso pesquisas têm sido realizadas baseando-se na produção de goma a partir de resíduos agroindustriais, seleção de novas linhagens e adequação nas condições ótimas de crescimento celular, produção, purificação e recuperação do polissacarídeo, com o objetivo de produzir goma xantana a nível industrial de alta qualidade e rendimento. Além disso, essas pesquisas podem trazer soluções para problemas ambientais resultantes do descarte inadequado de resíduos industriais, diminuindo assim o impacto ambiental causado por estes e diminuir o custo de produção da xantana (Luvielmo e Scamparini, 2009).

A utilização dos meios alternativos provenientes dos resíduos agroindustriais estão sendo reconhecidos como ingredientes de alto valor agregado para a produção de goma xantana. Alguns destes resíduos como o leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte serão estudados para a produção do biopolímero, visto que são boas alternativas devido às composições ricas em nutrientes e assim apresentar outro destino industrial.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi selecionar fontes de carbono alternativa tais como leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte para a *Xanthomonas campestris*, para a obtenção de polissacarídeos em quantidade e com propriedades economicamente interessantes, com alto rendimento, viscosidade e produtividade via planejamento de experimentos, modelos cinéticos e a aplicação da Transformada Z no bioprocesso.

2.1 Objetivos específicos

- Otimizar a produção de goma xantana em câmara rotativa *shaker* variando a concentração de substrato alternativo e de inóculo no meio fermentativo aplicando a metodologia de planejamento de experimentos;
- Avaliar e comparar os substratos alternativos (leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte) com a fonte de carbono padrão (sacarose);
- Analisar e avaliar os melhores rendimentos, viscosidades e, consequentemente, a produtividade;
- Caracterizar os meios alternativos;
- Produzir goma xantana utilizando Biorreator Coluna de Bolhas;
- Modelar o processo utilizando os modelos cinéticos de Monod e Verhulst;
- Estimar os parâmetros cinéticos Yx/s, Yx/p e Yp/s;
- Aplicar a Transformada Z no processo em estudo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biopolímeros

Os polissacarídeos são classificados de três formas quanto à sua origem, provenientes de plantas terrestres, que são subdivididas em estruturas (amido, celulose, pectina, dentre outras), exudados (goma arábica) e oriundos de sementes (goma guar e locusta); resultante de plantas aquáticas (ágar e carragena) e de microrganismos (dextrana, gelana, xantana, dentre outras). Estas últimas recebem a denominação de biopolímeros microbianos (Fornari, 2006).

Os biopolímeros microbianos são macromoléculas, polissacarídeos, formados por monossacarídeos e derivados ácidos, sintetizados por bactérias, fungos e leveduras (Fornari, 2006). Estes polímeros apresentam vasto campo de aplicação em diversos ramos industriais, como nas indústrias química, alimentícia, farmacêutica e petroquímica. As características reológicas são dependentes da composição química, que por sua vez, depende da cepa do microrganismo utilizado, da fonte de carbono e das condições utilizadas no processo fermentativo, como pH, temperatura, teor de oxigênio dissolvido e tempo de fermentação (Fornari, 2006; Brandão, 2012).

Os polissacarídeos microbianos são alternativas válidas por possuírem propriedades similares aos tradicionais e, em alguns casos até mais vantajosos, devido às suas propriedades específicas que o qualificam para o desenvolvimento de novos produtos. Estes não dependem de condições climáticas, não sofrem com contaminação marinha ou falha nas colheitas, que prejudicam a oferta das gomas tradicionais. Além disso, são menos suscetíveis à variabilidade em sua qualidade, pois a sua produção pode ser cuidadosamente controlada. Apresentam a desvantagem do seu elevado custo, pois isto se deve aos processos de produção que são intensivos em capital e energia (Fornari, 2006).

Estes polissacarídeos se destacam em relação aos demais por propriedades que o tornam comercialmente atrativos. Incluem-se entre essas propriedades alta viscosidade, maior poder gelificante, compatibilidade com uma grande variedade de sais numa ampla faixa de pH e temperatura, alta solubilidade em água e ação sinérgica com outros polissacarídeos. Além disso, o mercado mundial encontra-se desprovido de oferta de produtos que se adequam às novas tendências do moderno processamento de alimentos, tais como alimentos de baixo teor calórico, cozimento por micro-ondas, irradiação, aquecimento ôhmico, tratamento com ultra-som, etc. As gomas xantanas e dextranas são

praticamente os únicos polissacarídeos microbianos a serem produzidas em larga escala (Lima *et al.*, 2001).

3.2 Goma xantana

A goma xantana foi descoberta em meados da década de 1950, pelo *Northem Regional Research Laboratories* (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Os cientistas descobriram que a bactéria *Xanthomonas campestris* encontrada no repolho roxo produz um polissacarídeo extracelular com propriedades reológicas interessantes. Esta descoberta se tornou uma inovação e provocou grande interesse no mundo científico e industrial com aplicação nos segmentos de alimentos, fármacos, químico e de petróleo (Canuto, 2006; Brandão, 2012).

Esta goma é um heteropolissacarídeo exocelular produzido por bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas*. O biopolímero é aniônico e possui unidades repetidas de pentassacarídeos, com massa molar aproximada de 2 x 10^6 Da, podendo atingir até 50 x 10^6 Da (Brandão, 2012).

A produção é realizada via fermentação aeróbia. O polissacarídeo formado é utilizado como forma de proteção da bactéria contra microrganismos e bacteriófagos, pois libera o biopolímero no meio e causa a mudança da reologia deste. A goma é um copolímero e possui estrutura primária formada por uma cadeia principal de unidades de β-D-glicose ligadas nas posições 1,4. As ramificações são compostas por uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose (Figura 1). Estas ocorrem em unidades alternadas de β-D-glicose, sendo a ligação com as unidades de manose do tipo α-1,3 (Becker *et al.*, 1998). O polissacarídeo aniônico é formado pela presença dos ácidos acético e pirúvico (García-Ochoa *et al*., 2000; Casas *et al*., 2000; Mothé e Correia, 2002; Canuto, 2006; Nery *et al.*, 2008; Luvielmo e Scamparini, 2009; Brandão, 2012).

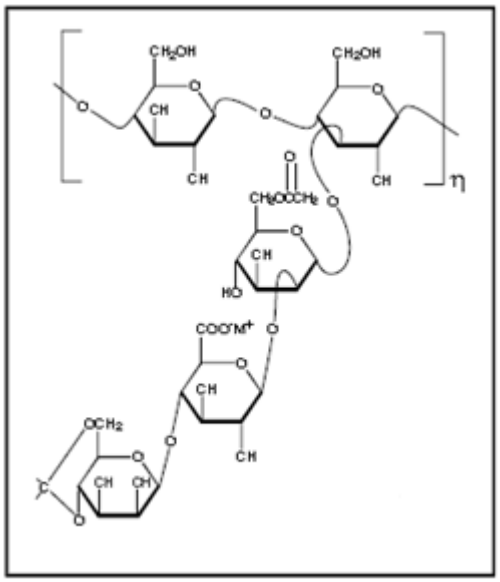


Figura 1. Estrutura molecular do polímero goma xantana produzido por *X. campestris* (modificado de Brandão, 2012).

A estrutura secundária possui grupamentos laterais que se entrelaçam ao longo da estrutura em hélice, criando uma macromolécula rígida e semelhante a uma haste, resultando em um comportamento de espessante. A conformação do biopolímero sofre transição de molécula ordenada (hélice) para desordenada (novelo) devido a ação do calor, força iônica, pH e concentrações poliméricas, diminuindo o volume hidrodinâmico efetivo e a viscosidade. A forma desordenada é favorecida por baixas concentrações de sais e por altas temperaturas (Mothé e Correia, 2002 Fornari, 2006; Brandão, 2012).

O sinergismo entre os polissacarídeos é de grande interesse comercial, pois além de possibilitar novas funcionalidades, pode reduzir a quantidade de polissacarídeos usados, reduzindo os custos. A combinação destes podem ocasionar um escoamento desejado. Quando a interação é positiva, ocorre a viscosidade ou a gelificação (Mothé e Correia, 2002).

A estabilidade da xantana depende da concentração: quanto maior a concentração, maior a estabilidade da solução. Na indústria de alimentos, após a esterilização de diferentes gomas a uma temperatura de 120°C por 30 minutos, apenas a xantana diminui em 10% a sua viscosidade, enquanto as demais como a goma guar, a carboximetilcelulose e alginato apresentam perda maior desta característica (Luvielmo e Scamparini, 2009).

A goma xantana possui característica principal em modificar a reologia ou o comportamento do fluido formando soluções altamente viscosas em baixas concentrações (0,05 a 1%), possui estabilidade em uma ampla faixa de pH (2,5< pH<11), é estável em temperatura de 10°C a 90°C e em concentração de sais, se dispersa em água fria ou quente, apresenta estabilidade em meios ácidos, ao congelamento e descongelamento, o que a difere das demais gomas solúveis em água (Nery *et al.*, 2008; Luvielmo e Scamparini, 2009; Brandão, 2012).

Por isso é de extrema importância comercial podendo ser empregada em diversas indústrias. Ainda é importante ressaltar, que as soluções de goma xantana são pseudoplásticas. Esse comportamento resulta em uma estrutura em rede totalmente organizada formada por ligações de hidrogênio e pelo emaranhamento do polímero, o que contribui para alta viscosidade em baixas taxas de cisalhamento. Com o aumento da taxa de cisalhamento, ocorre a desagregação dessa rede e o alinhamento das moléculas individuais do polímero na direção da força cisalhante (Fox *et al.*, 2004).

Do ponto de vista comercial, a goma xantana é o polissacarídeo microbiano mais importante, com uma produção mundial de cerca de 40.000 toneladas ao ano, movimentando um mercado atual de aproximadamente US$ 270 milhões, onde se estimou atingir US$ 400 milhões e 80.000 toneladas no ano de 2015. As principais indústrias produtoras de xantana são as americanas Kelco e Pfizer e as francesas Rhôde-Pouçenc e Mero-Rousselot-Santia (Lima *et al.*, 2001; Ramos, 2011; Brandão, 2012).

O Brasil é o maior produtor das matérias-primas principais para a produção da goma xantana que são a sacarose, fonte padrão de carbono do meio fermentativo, e o etanol, utilizado como solvente para a precipitação do biopolímero, provenientes da lavoura de cana-de-açúcar. Desta forma, o país possui alto potencial para a produção do polissacarídeo (Brandão, 2012).

Muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de realizar o melhoramento das linhagens de *Xanthomonas*, dos meios de cultivo e dos processos de fermentação, extração e purificação da goma xantana. Grande parte da literatura referente à produção desta cita o uso de glicose ou sacarose como fonte de carbono preferencial, entretanto, fontes alternativas têm sido estudadas e sugeridas visando à produção, a redução dos custos de produção e de problemas relacionados às questões ambientais com o aproveitamento de resíduos industriais e da agricultura (Brandão, 2012).

Há ainda pesquisas voltadas para a produção de goma xantana com alta viscosidade, já que quanto menor o percentual do biopolímero utilizado para atingir a

viscosidade, textura ou estabilidade desejada, menor será o custo do produto final. Da mesma forma, tenta-se atingir as especificações para a área de exploração de petróleo para obtenção de produtos com alta viscosidade e parâmetros reológicos adequados para a utilização em fluidos de perfuração de petróleo (García-Ochoa *et al*., 2000).

Nem todas as aplicações do biopolímero requerem alta viscosidade como é o caso na retenção de aromas e em agentes suspensivos onde são requeridos para estes casos, cepas que produzam xantana com baixa viscosidade. As propriedades destas gomas citadas são determinadas por sua composição química, dependente principalmente da quantidade de substituintes acetil e piruvil, da massa molecular do polímero, arranjos e das ligações moleculares. A composição química, o meio fermentativo, as cepas de *Xanthomonas* e as condições operacionais do processo influenciam no rendimento da goma resultante (García-Ochoa *et al*., 2000).

3.3 Bactéria *Xanthomonas campestris*

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* (do grego xanthos = amarelo e monas = unidade) pertencem à família *Pseudomaceae*. São bactérias fitopatogênicas, com exceção da *Xanthomonas maltophilia*. Apresentam em sua maioria, como colônias mucóides, amarelas (Figura 2) e quando a bactéria infecta a planta, ela produz um polissacarídeo de alta massa molar conhecido como goma xantana (García-Ochoa *et al*., 2000; Roll *et al.*, 2004; Luvielmo e Scamparini, 2009; Ramos, 2011).

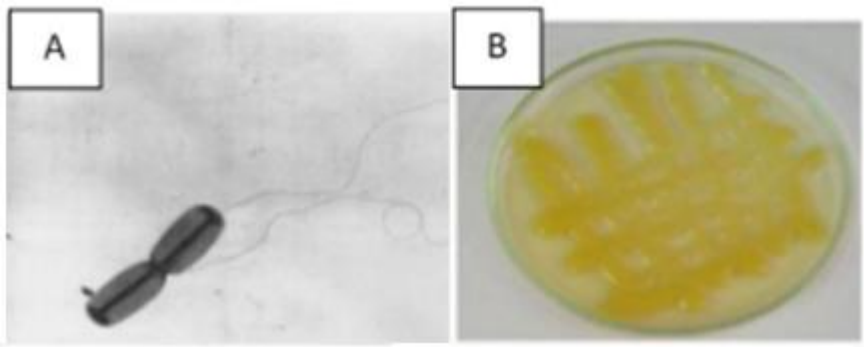


Figura 2. *Xanthomonas campestris*. A) Micrografia eletrônica de transmissão (x 12.000); B) Aspectos do crescimento de *X. campestris* em meio YM (Ramos, 2011).

A bactéria *X. campestris* foi isolada em 1940 e é a espécie mais numerosa e abundante, diferenciando-se em aproximadamente 125 patovares (cepas de

microrganismos que possuem características similares). As espécies não produzem esporos, são gram-negativas e aeróbias estritas. São amplamente distribuídas e infectam mais de 120 monocotiledôneas e dicotiledôneas e mais de 150 espécies de plantas (García-Ochoa *et al*., 2000).

Esta bactéria infecta diversas espécies de crucíferas, muitas delas de interesse na agricultura, como a alcachofra, a berinjela, o brócolis, a couve, a couve-flor, o algodão, a ameixa, o maracujá, a mostarda, a pimenta, o pimentão, o repolho, o tomate, o pêssego e outras; causando lesões nos frutos, folhas, ramos e raízes, resultando no escurecimento dos vasos condutores, causando a morte destas plantas e consequentemente, grandes perdas econômicas (Luvielmo e Scamparini, 2009; Brandão, 2012).

A Podridão Negra é uma das mais sérias bacterioses que podem ocorrer em plantas, causada pela *X. campestris pv. campestris*. Essa doença pode ser observada em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e caracteriza-se por veias nas folhas que se tornam amarelas e negras. Apresenta desenvolvimento rápido, propagando-se em poucas semanas, levando a planta à morte (Luvielmo e Scamparini, 2009; Brandão, 2012). A Figura 3 mostra uma folha de couve infectada pela bactéria.

Figura 3. Folha de couve infectada pela bactéria *X. campestris* (modificado de García-Ochoa *et al.*, 2000).

Uma forma de melhoramento da produção e das propriedades reológicas da goma xantana é o isolamento e a triagem da bactéria do habitat natural. As cepas da bactéria utilizadas para a produção do biopolímero são selecionadas e cultivadas por métodos convencionais como a repicagem tubo-a-tubo, que consiste em repicar o

microrganismo em um tubo de cultura para outro em determinados intervalos de tempo. O armazenamento é feito à temperatura de 4°C após o crescimento da cultura (Baiocco, 1997; Brandão, 2012).

As linhagens da bactéria podem ser modificadas geneticamente a fim de melhorar as propriedades desejadas com o objetivo de aumentar a produção, reduzir o tempo de fermentação e simplificar a recuperação e purificação do produto no processo (Rosalam e England, 2006; Mesomo, 2006).

3.4 Processo fermentativo para obtenção da goma xantana

A goma xantana é produzida sob condições aeróbias pela bactéria *X. campestris* e as temperaturas podem variar de 25°C a 34°C devido ao meio de produção utilizado. Para meios otimizados a temperatura ótima empregada é de 28°C aproximadamente (García-Ochoa *et al*., 2000). O meio de cultura consiste basicamente de glicose ou sacarose como fonte de carbono, fontes de fósforo e nitrogênio e traços de outros minerais. O pH deve ser mantido em torno da neutralidade (pH 7). O polímero é sintetizado principalmente ao cessar o crescimento microbiano, o que caracteriza um metabólito secundário (Brandão, 2012).

O processo geral de produção de goma xantana consiste primeiramente da seleção e preservação da cepa microbiana. A estocagem deverá ser feita por longos períodos através de métodos que mantenham as propriedades desejadas (Figura 4). Uma forma de manutenção do microrganismo é a técnica de repicagem, onde estes são retirados do meio de cultura e adicionados em um novo para crescer. O meio esterilizado é então inoculado com a cultura selecionada, na etapa de fermentação, que ocorre por incubação a 28°C sob agitação controlada por 120 horas. Após o término da fermentação, é necessária a recuperação do polissacarídeo formado através da precipitação e filtração. A precipitação consiste em diminuir a solubilidade do colóide dissolvido utilizando solvente (isopropanol, etanol ou acetona) ou adição de sais (Brandão, 2012; Menezes *et al.*, 2012).

O meio resultante contém o biopolímero, resíduos de nutrientes, células e outros metabólitos. As células podem ser eliminadas através da centrifugação, pois o produto final não deve conter cepas da bactéria, o que pode afetar diretamente a performace do produto em suas aplicações, sendo essencial a sua remoção. Normalmente, a goma

xantana é recuperada por precipitação com etanol 99,5° GL e utiliza-se a relação de 3:1 de etanol e meio fermentado.

A precipitação com solventes resulta em purificação parcial do polímero por eliminar componentes solúveis no solvente. A adição de sais na concentração adequada também provoca precipitação, reduzindo a quantidade de álcool, quando este e os sais são utilizados em combinação (Ramos, 2011).

O biopolímero pode ser recuperado por concentração através da evaporação do mosto. Esta técnica pode ser utilizada por ser economicamente viável, porém apresenta a desvantagem de resultar em um produto de qualidade inferior, por possuir células, compostos que não foram metabolizados, sais, outros metabólitos e ainda possuir uma coloração intensa (Ramos, 2011).

Após a precipitação, ocorre o processo de secagem, onde os polímeros são secos em estufa, a baixas temperaturas (40°C). As condições de secagem devem evitar a degradação química, coloração excessiva ou mudanças na solubilidade do produto. A secagem rápida a altas temperaturas pode resultar em um produto com baixa solubilidade ou com baixa viscosidade. O polímero depois de seco pode ser moído. Algumas gomas comerciais são diferenciadas por tamanho de partículas (Brandão, 2012).

O método específico para a purificação é determinado pela aplicação do polissacarídeo. Nas formulações comerciais de xantana muitas vezes são adicionados sais, predominantemente sais de potássio, mas também podem ser utilizados sais de cálcio e sódio na forma de cloretos, para facilitar a solubilização, aumentar a viscosidade e manter a estabilidade (Mecca, 2006; Ramos, 2011).

A bactéria *X. campestris* apresenta grande versatilidade nutricional. O polissacarídeo pode ser obtido nos mais variados meios de cultura, com isso pode apresentar variados rendimentos, massas molares e composições, assim como no grau de piruvilação e acetilação, o que interfere diretamente na sua composição química e consequentemente, nas propriedades reológicas e na qualidade dos produtos (Lima *et al.*, 2001; Brandão, 2012; Diniz *et al.*, 2012).

Um problema relacionado com a produção de goma xantana deve-se à instabilidade das linhagens da bactéria, o que resulta em variação de massa molar do polissacarídeo, assim como no grau de piruvilação e acetilação. A caracterização molecular das linhagens envolvidas na pesquisa permite o conhecimento da ocorrência de mutações durante os sucessivos repiques ao qual o microrganismo será submetido. É

interessante utilizar o procedimento massivo e fracionado em pequenos volumes, armazenados em glicerol sob forte refrigeração para evitar alterações genéticas (Ramos, 2011).

A produção industrial de goma xantana é feita, geralmente, com sacarose como fonte de carbono além da fonte de nitrogênio e sais minerais que são adicionados como suplementos para o meio fermentescível. O custo do meio fica em torno de 20 a 30% do processo total. Com a crescente demanda do mercado, estudos têm sido conduzidos a fim de se utilizar novas alternativas como fonte de carbono para a produção de xantana, entre eles estão resíduos agroindustriais como o soro de leite (Nery *et al.*, 2008), resíduo de cacau (Diniz *et al.*, 2012), resíduo de polpa de beterraba, soro de mandioca, resíduo de suco de maçã, casca de coco (Menezes *et al.*, 2012), melaço de açúcar de beterraba, resíduos agrícolas, extrato de levedura, glicerol (Brandão, 2012), entre outros. Frequentemente, é necessária a adição de alguns sais contendo geralmente, nitrogênio e fósforo para a suplementação do meio (Brandão, 2012).

O processo fermentativo como ilustrado na Figura 4 pode ser realizado por fermentação submersa de duas maneiras, descontínua ou contínua. Na fermentação descontínua ou em batelada, o cultivo das bactérias é adicionado ao meio contendo os substratos necessários ao desenvolvimento do microrganismo (Brandão, 2012).

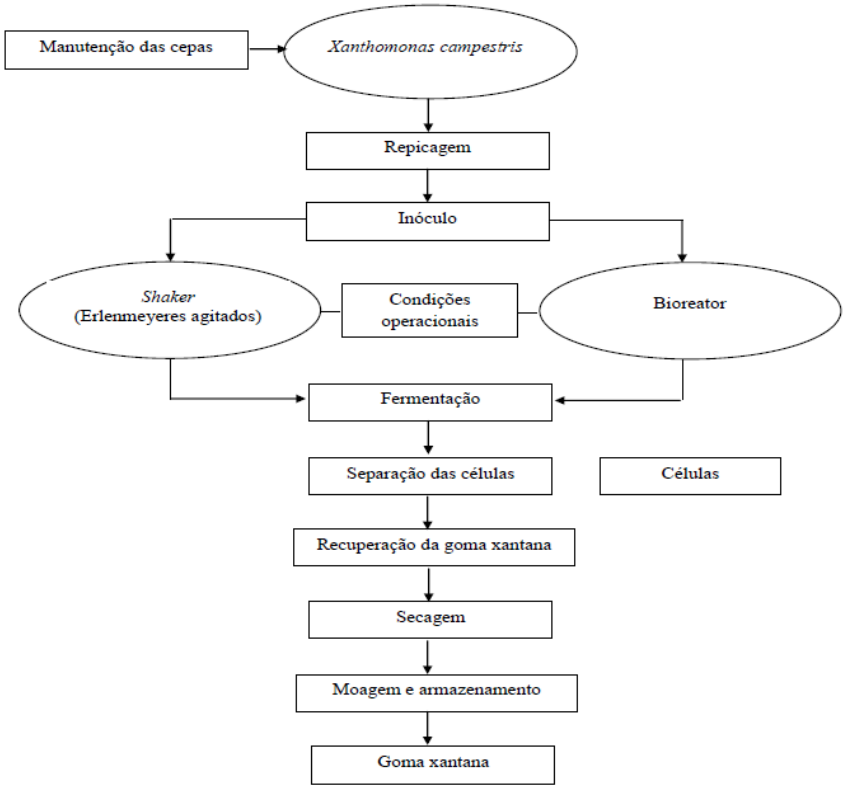


Figura 4. Processo de produção da goma xantana (Brandão, 2012).

O processo fermentativo é finalizado quando a concentração do produto atingir seu valor máximo. Em escala laboratorial, o procedimento é realizado em agitadores orbitais (*shakers)* ou em reatores. Nos *shakers*, o processo é mais simples, onde controla-se apenas a temperatura, o tempo e a agitação orbital do processo. Em reatores o controle é mais rigoroso sendo possível monitorar outros parâmetros como a concentração de oxigênio dissolvido, o pH, a adição de substrato e de antiespumante. No processo contínuo, o meio esterilizado é adicionado continuamente durante o processo e os produtos são removidos sem interromper o processo (Brandão, 2008).

3.5 Viscosidade aparente

A viscosimetria pode fornecer informações importantes a respeito da morfologia da partícula hidrodinâmica. Uma importante indicação de que o biopolímero tem propriedades funcionais com viabilidade de aplicação comercial como agente espessante, estruturante ou gelificante, é o resultado da medida da viscosidade aparente de suas soluções aquosas (Faria, 2005; Ramos, 2011).

A viscosidade é a capacidade do fluido de resistir ao escoamento e é causada pelo atrito interno das partículas. A xantana exibe alta viscosidade até mesmo em baixas concentrações, por isso apresenta diversas aplicações. As soluções de xantana mostram um comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da deformação do fluido e esta é uma característica muito desejada em diversas situações. Os polissacarídeos que possuem este comportamento provocam menos sensação de gomosidade na boca do que aqueles com comportamento newtoniano (é aquele em que a viscosidade se mantém inalterada com o aumento da taxa de deformação). A viscosidade das soluções de xantana é dependente da composição química e aumenta com a concentração do biopolímero. Atribui-se este comportamento a interação molecular, aumentando a dimensão efetiva da macromolécula e a massa molar (Brandão, 2012).

De uma forma geral é citado na literatura que as soluções de goma xantana, em comparação a outros polímeros, são resistentes à degradação pelo calor. Estas se mantêm sem grandes alterações de viscosidade a elevadas temperaturas por prolongados períodos de tempo, havendo somente uma pequena mudança que é observada quando as soluções são autoclavadas (Ramos, 2011).

3.6 Aplicações da goma xantana

A goma xantana devido às suas propriedades pode ser utilizada nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica, química, agropecuária e petroquímica (Luvielmo e Scamparini, 2009; Brandão, 2012; Menezes *et al.*, 2012).

A utilização de polímeros microbianos destinados à alimentação humana é uma tarefa mais complexa, pois estes devem ser considerados seguros para o consumo e atender aos requisitos das legislações de alimentos em vigor. Apesar do grande número de pesquisas realizadas há mais de três décadas, apenas três polissacarídeos estão aprovados para o uso em alimentos nos Estados Unidos: a xantana produzida por *X. campestris*, gelana por *Sphingomonas* e dextrana por *Leuconostoc* (Brandão, 2012).

As gomas alimentícias possuem ampla gama de compatibilidade com muitos ingredientes alimentares, não alimentares e aditivos. A goma xantana pode ser utilizada em alimentos, pois é atóxica, não provoca sensibilização e nem irritação na pele e nos olhos (García-Ochoa *et al*., 2000; Luvielmo e Scamparini, 2009).

Na indústria de alimentos, a goma xantana é utilizada em menores concentrações, normalmente, de 0,5 a 5%, e geralmente não contribuem para o valor nutricional, aroma e paladar do produto (Rosalam e England, 2006). Estes polissacarídeos podem controlar a textura e estabilizar uma série de fenômenos físicos nos alimentos industrializados, prevenindo ou retardando a sedimentação de partículas sólidas suspensas no meio como nos sucos e a agregação ou desagregação de partículas sólidas suspensas. Além disso, podem prevenir a cristalização da água e do açúcar. Estas características contribuem para uma maior aceitação dos consumidores por produtos que contém goma xantana (Menezes *et al.*, 2012).

Em produtos congelados, o polissacarídeo garante estabilidade e age como crioprotetor, pois retém a água durante os ciclos de congelamento e descongelamento, reduzindo desta forma, a formação de cristais de gelo (Mesomo, 2006; Mesomo, 2009). Evita ainda a desagregação gravitacional e mecânica quando o produto é submetido a oscilações de temperaturas durante a estocagem e o transporte dos produtos (Marcotte *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2012).

A goma xantana pode agir em combinação com outro hidrocolóide para estabilizar iogurtes e sobremesas lácteas, além de ser utilizada na formulação de alimentos isentos ou com baixo teor de gordura. Suas propriedades pseudoplásticas facilitam o bombeamento, o envase e a retirada do produto da embalagem. Este

biopolímero junto com galactomanana é utilizada em sobremesas cremosas prevenindo a sinérese (Menezes *et al.*, 2012).

A goma xantana apresenta compatibilidade e estabilidade com muitos colóides usados em alimentos, como o amido, que é ideal para o setor de panificação, pois aumenta a vida de prateleira, devido à absorção de água nos pães e melhora a massa e a textura final (Mesomo, 2006; Luvielmo e Scamparini, 2009). Além disso, a xantana é compatível com proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos como a pectina, podendo ser utilizada em produtos de baixa caloria (*light*), agindo como agente de retenção de água e na redução do teor de gordura. O biopolímero passa pelo trato gastro-intestinal com pouca ou nenhuma modificação, o que confere aos produtos valores não calóricos. A goma xantana pode ainda ser utilizada para a elaboração de bolos sem glúten destinados aos celíacos (Mothé e Correia, 2002; Menezes *et al.*, 2012).

Na indústria farmacêutica, cosmética e de produtos de higiene a goma xantana pode ser utilizada impedindo a separação de ingredientes não solúveis em xaropes, cremes, emulsões ou suspensões. Também pode ser utilizada para prolongar o tempo de contato do composto ativo em comprimidos e pastilhas (García-Ochoa *et al.* , 2000; Mesomo, 2006). Nos cosméticos o polissacarídeo é utilizado em cremes e géis, proporcionando suavidade e maciez devido a sua pseudoplasticidade. Em cremes dentais, pode ser utilizada fornecendo uniformidade, tornando seu aspecto mais liso e facilitando sua saída do tubo. Em xampus é utilizada para ajustar a viscosidade e a propriedade de escoamento, pode ainda ser utilizada como agente suspensor quando há a presença de substâncias insolúveis como pigmentos ou outros componentes ativos (Canuto, 2006; Menezes *et al.*, 2012).

De acordo com Luvielmo e Scamparini (2009), a goma xantana pode ser utilizada na agricultura como estabilizante em pulverizadores fungicidas, pesticidas, herbicidas e em fertilizantes, controlando o tamanho das gotículas. Pode atuar como adjuvante em vacina contra a herpes suína e melhorar a aderência entre o componente ativo e a planta, aumentando o tempo de contato entre eles (Becker *et al.*, 1998; Palaniraj; Jayaraman, 2011; Menezes *et al.*, 2012).

Na indústria petroquímica, a goma xantana é o único polímero a ser utilizado na recuperação terciária de petróleo, como aditivo em fluidos de perfuração de petróleo conferindo estabilidade e viscosidade. Como a goma não é sujeita à degradação por cisalhamento e é termoresistente pode ser utilizada na perfuração, no transporte dos detritos de perfuração, na separação na superfície, no resfriamento e limpeza da broca,

na estabilidade do poço, na prevenção do escoamento do fluido para o interior das formações e na formação de um filme de baixa permeabilidade (reboco) nas paredes do poço (Luvielmo e Scamparini, 2009; Ramos, 2011; Brandão, 2012; Fernandes *et al.*, 2012).

3.7 Meio de cultura para a produção de goma xantana

O cultivo de microrganismos *in vitro* deve ser feito através da simulação ou melhoramento das condições naturais do ambiente bem como dos meios de cultura mais apropriados utilizando nutrientes corretos para que estes se desenvolvam (Tortora, 2005).

As exigências nutricionais dos microrganismos são variadas de acordo com a espécie e devem ser satisfeitas através de inúmeros meios de cultura, sendo importante conhecer as suas necessidades para se ter sucesso na cultura em laboratório. No entanto, há determinadas substâncias cuja necessidade é comum a todos. O meio de cultura deve conter ainda a quantidade de água necessária, o pH ajustado e a quantidade específica de oxigênio (Tortora, 2005).

O meio de cultura é uma preparação de nutrientes em quantidades e proporções corretas para a manutenção, crescimento e multiplicação dos microrganismos (bactérias, fungos, leveduras, algas, parasitas) em laboratório e devem conter, principalmente, fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, macro e micronutrientes. Um inóculo é quando um microrganismo é colocado em um meio de cultura para crescer (Tortora, 2005).

3.8 Meio padrão - Sacarose

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma unidade de glicose unida a uma unidade de frutose (Lehninger *et al.*, 2002).

A sacarose é muito utilizada como fonte de carbono preferencial em processos fermentativos. Pesquisadores testaram várias formulações de meio de crescimento utilizando como fonte de carbono a sacarose, glicose, lactose e amido, nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 $g.L^{-1}$, e foi observado maior síntese de polissacarídeo exocelular quando 50 $g.L^{-1}$ de sacarose foram utilizadas como fonte de carbono, comparada às mesmas condições de glicose, lactose e amido (Brandão, 2012).

3.9 Substratos alternativos

3.9.1 Leite de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é originária da América do Sul e constitui um dos principais alimentos para milhões de pessoas em todo mundo, sobretudo em países em desenvolvimento, onde é cultivada em pequenas áreas com baixo nível tecnológico. A África é o maior continente produtor, sendo a Nigéria o país com maior produção. O vegetal neste continente é destinado à subsistência e consumido predominantemente *in natura* sendo a base alimentar para milhões de pessoas. O Brasil é o segundo maior produtor, com produção de 26,5 milhões de toneladas em 2008, o que equivale a 11,9 % da produção mundial (Agostini, 2006; Felipe *et. al*, 2009). Segundo a FAO, a produção mundial de mandioca atingiu 275 milhões de toneladas no ano de 2013 (SEAB, 2015).

Esta cultura é uma das principais do país e é cultivada em todos os estados brasileiros, principalmente no Pará, Paraná e Bahia, e possui facilidade de adaptação. O seu cultivo emprega muitas famílias na produção e processamento da farinha e de outros produtos, desempenhando grande importância econômica para as regiões produtoras (Agostini, 2006; Chisté *et. al*, 2007; Sociedade brasileira de mandioca, 2010; Embrapa, 2013).

A mandioca é um alimento que apresenta proteínas (1,1%), carboidratos (36,2%), fibra alimentar (1,9%), cálcio (0,015%), magnésio (0,044%), vitamina C (0,021%), entre outros (Valle, 2007; IBGE 2009; Abath, 2013). O teor de amido pode variar de acordo com a época do plantio, colheita, idade da planta, altitude, temperatura, entre outros (Agostini, 2006).

Este vegetal é consumido na forma direta através do processamento da farinha para uso culinário ou industrial. A industrialização aparece como uma alternativa para o melhor aproveitamento do vegetal na forma de farinhas (cruas ou torradas) e polvilhos (doce ou azedo) para consumo humano, transformado em amido ou fécula para a indústria e na forma de raspas e resíduos da própria indústria, para consumo animal. As folhas e ramas possuem um potencial nutritivo que pode ser utilizado também para a alimentação humana e animal, podendo ser acrescido em rações (Suframa, 2003; Agostini, 2006; Valle, 2007).

O processamento da mandioca gera resíduos poluentes, principalmente quando não é tratado de forma adequada. Dentre estes resíduos, destaca-se a manipueira, que é

altamente prejudicial ao meio ambiente quando despejada sem tratamento em leitos de rios ou lençóis freáticos causando sérios impactos ambientais como a eutrofização de lagos e rios, por possuir grandes quantidades de nutrientes (Felipe *et. al*, 2009).

Os “leites vegetais” são bebidas a base de extratos vegetais como soja, milho, arroz, castanha, entre outras e podem ser os substitutos de origem vegetal do leite animal. Essas bebidas são utilizadas em casos de alergia à proteína do leite de vaca e intolerância à lactose (Abath, 2013).

O leite de mandioca proposto utiliza a mandioca já descascada, lavada, cortada em cubos menores e água. Este leite vegetal apresenta em sua composição proteínas, carboidratos, fibras alimentares, cálcio, magnésio, vitamina C, entre outros (Abath, 2013).

3.9.2 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é originária da Nova Guiné e o Brasil é o maior produtor mundial deste vegetal, sendo responsável por 25% da produção. Na safra de 2013/2014 a produção mundial foi cerca de 174,8 milhões de toneladas de açúcar (Conab, 2016).

A lavoura da cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil. A safra estimada para 2016/2017 é de 684,77 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, distribuídas em todos os estados produtores, sendo cerca de 50% da cana produzida no estado de São Paulo, seguido de Minas Gerais, Goiás, Paraná e demais estados. O crescimento está previsto em 2,9% em relação à safra anterior. Considerando a riqueza nutricional do caldo de cana (sacarose, glicose, frutose, fibra, celulose, minerais e demais micronutrientes), esta é utilizada na produção de açúcar, álcool, melados, cachaça, rum, combustível, biodiesel e na co-geração de energia a partir do bagaço (Faria, 2005; Brandão *et. al*., 2008; Conab, 2016; Nogueira e Garcia, 2013).

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* e recebe o nome botânico de *Saccharum spp*. Compõe essencialmente duas partes: uma subterrânea constituída pelos rizomas e pelas raízes e a outra, pelo colmo, folhas e flores. O colmo é o mais importante componente, sob o ponto de vista industrial. Este é constituído por gomos ou entrenós, pelos nós e pelas gemas, e é no primeiro que se encontram as células responsáveis pela principal função de armazenar o caldo da planta. A Figura 5 representa a constituição morfológica da cana-de-açúcar (Ernesto, 2009).

A cana-de-açúcar apresenta em sua composição de 84 a 90% de caldo e de 10 a 16% de fibra. Da parte líquida, cerca de 75 a 82% são constituídos por água, 18 a 25% de sólidos solúveis, 15,5 a 24% de açúcares (4,5 a 24% de sacarose; 0,2 a 1,0% glicose e 0 a 0,5% de frutose). Os compostos orgânicos aminoácidos, gorduras, ceras, entres outros constituem cerca de 0,8 a 1,8% e os inorgânicos sílica, potássio, fósforo, magnésio, cálcio, sódio, ferro, entre outros, 0,2 a 0,7% (Ernesto, 2009).

A composição química da cana-de-açúcar depende da interação de vários fatores: variedade, clima, propriedades físicas e químicas do solo, irrigação, florescimento, adubação, sistema de despalha (manual ou a fogo), tempo decorrido após a última colheita e tempo de armazenamento. Algumas considerações são importantes ao se escolher uma variedade apropriada para o cultivo como, qualidade do suco, faixa etária, adaptação às condições de cultivo, tipo de solo, regime de irrigação, resistência a pestes e doenças, potencial de safra e alto teor de sacarose. A escolha ainda deve ser feita priorizando a minimização de custos de manejo e da colheita (Ernesto, 2009).

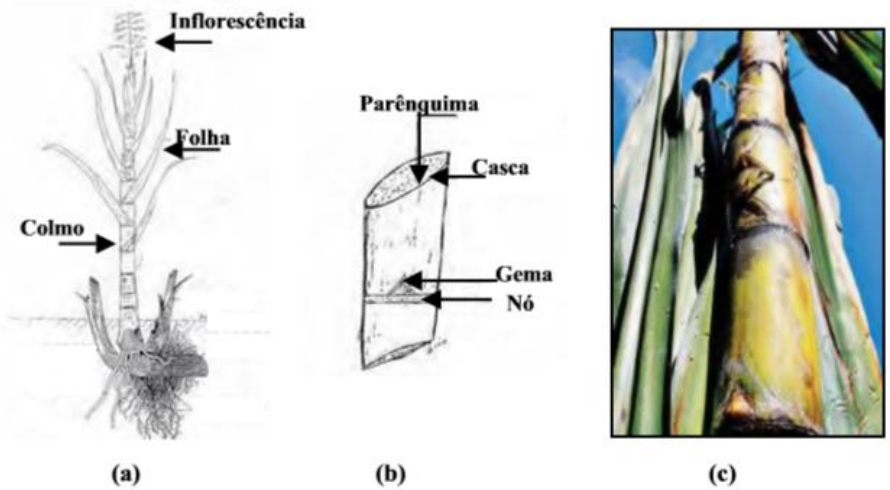


Figura 5. (a) Constituição morfológica da cana-de-açúcar, (b) localização do parênquima no colmo; (c) cana-de-açúcar (Ernesto, 2009).

A busca por alternativas de utilização e valorização de resíduos industriais tornando-os subprodutos com valor agregado passou a ser mais incentivado de forma a aproveitá-los em diversas atividades, o que contribui de forma positiva para a questão ambiental. Buscas por processos de sustentabilidades e aumento de ganhos faz com que produtos antes considerados problemas passem hoje a ser fontes de renda consideráveis para as empresas (Nogueira e Garcia, 2013; Gomes *et. al*, 2015).

O bagaço de cana-de-açúcar é resultante da extração do caldo de cana-de-açúcar e é um material lignocelulósico de baixo custo e pode ser fonte para a produção de bioplásticos, biocombustíveis e biomateriais, além de gerar eletricidade nas usinas sucroalcooleiras. A celulose proveniente do bagaço pode ser convertida em glicose e ser utilizada, desta forma, como fonte de carbono para processos fermentativos (Battistelle *et. al*, 2008; Selvi, Vijayagopal, 2014).

O setor sucroalcooleiro é conhecido por gerar uma quantidade enorme de bagaço em uma taxa de 135 m^3.$tonelada^{-1}$ de cana-de-açúcar e pode ser utilizado em bioprocessos, diminuindo os custos da produção do biopolímero e, conseqüentemente, diminuindo os riscos ambientais. Quando estes não são gerenciados de forma adequada, aumentam os riscos de problemas ao meio ambiente, pois o bagaço *in natura* é composto, aproximadamente, por 44,5% de fibras lignocelulósicas, 50% de umidade, 2,5% de sólidos solúveis em água e 3% de cinza (Battistelle *et. al*, 2008; Nogueira e Garcia, 2013; Gomes *et. al*, 2015).

3.9.3 Biomassa de malte

O Brasil possui destaque na economia mundial por ocupar em 2010 o 3° lugar em volume na produção mundial de cerveja com 12,6 bilhões de litros, atrás apenas da China e dos Estados Unidos (Menezes, 2013). Em 2015 a produção brasileira cresceu e passou para 13,8 bilhões de litros ao ano. O setor cervejeiro no Brasil é um dos mais importantes e relevantes na economia com investimento próximo aos R$ 20 bilhões entre 2011 e 2014 e este setor tende a crescer (CervBrasil, 2015).

Os efluentes da indústria cervejeira apresentam, usualmente, em sua composição, alto potencial de poluição pela sua carga orgânica, com teor de sólidos em suspensão e presença de fósforo e nitrogênio. Os resíduos sólidos são gerados principalmente nas etapas de filtragem, envase e tratamento de água e efluentes líquidos e geralmente, são constituídos de restos de cascas e polpa de grãos, misturados, em suspensão ou dissolvidos no mosto oriundos dos grãos de malte (Menezes, 2013).

Segundo Menezes (2013), o setor cervejeiro caracteriza-se por consumir grande quantidade de recursos naturais como a água. Esta deve ser de excelente qualidade e em algumas situações pode ser tratada para deixá-la adequada para a sua utilização na indústria. Este setor por possuir muitas operações centradas na fermentação e repletas de etapas de limpeza, é grande a vazão de efluentes gerados. Os valores da demanda

bioquímica de oxigênio (DBO) e da demanda química de oxigênio (DQO) presentes no lixiviado gerado a partir do resíduo úmido da cervejaria são elevados, o que indica um alto poder poluente e explicita a necessidade de uma adequada destinação para este resíduo, a fim de que passivos ambientais sejam evitados.

O resíduo do mosto cervejeiro é o produto de maior importância na indústria cervejeira e pode ser aproveitado como fonte de alimento para bovinos, caprinos, ovinos e suínos, pois apresenta elevada quantidade nutricional (Menezes, 2013).

O resíduo de cervejaria pode apresentar na forma de resíduo úmido, prensado, seco e de levedo de cerveja. A biomassa de malte é o resíduo do malte de cevada obtido após a etapa de elaboração do mosto cervejeiro. Este resíduo é composto, principalmente, pela casca da cevada e apresenta em sua composição 28,4% de hemiclulose, 27,8% de lignina e 16,8% de celulose, além de proteínas e cinzas, em menores proporções (Menezes, 2013).

A biomassa de malte apresenta características favoráveis para uso em processos fermentativos devido à elevada concentração de açúcares presentes e baixa concentração de compostos tóxicos aos microrganismos tais como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e fenólicos (Menezes, 2013).

O resíduo de cevada pode ser usado na obtenção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus niger*, sem suplementação de nutrientes e sem tratamento específico para remoção dos nutrientes do resíduo. Este não possui substâncias que impeçam o crescimento deste fungo (Menezes, 2013).

3.10 Planejamento Experimental

A otimização das condições operacionais de produção de goma xantana na escala de bancada leva em consideração as condições operacionais como tipo de escala fermentativa, das condições operacionais de fermentação (agitação, aeração, temperatura), das condições do meio e dos nutrientes utilizados bem como o tipo de cepa da bactéria utilizada. A utilização de fonte de carbono, glicose ou sacarose, requer uma maior suplementação para obter um bom rendimento de xantana, diferentemente quando são utilizados substratos alternativos, onde a suplementação menor de nutrientes é necessária além de representar um baixo custo de processo (Brandão, 2012).

O alcance das condições operacionais de processo associado aos parâmetros físico-químicos é importante para o desenvolvimento de um processo. O planejamento

fatorial propõe uma diversidade de interações combinatórias entre os componentes do meio fermentativo e dos produtos metabólicos (Abdel-Fattah, 2005; Brandão, 2012).

O planejamento experimental associado à análise de superfícies de respostas é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro. O planejamento experimental reduz o número de experimentos ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados. Permite ainda analisar os fatores simultaneamente, calcular e avaliar o erro experimental, podendo especificar o nível de confiança estatística do experimento e a reprodutibilidade do resultado desejado (Rodrigues e Iemma, 2009).

Projetos estatísticos experimentais têm sido muito utilizados como uma estratégia de otimização ou de busca de condições ideais para uma resposta específica. Os planejamentos experimentais estatísticos têm sido muito utilizados na otimização de processos fermentativos para a seleção de variáveis, pois é um sistema de modelagem empírica que avalia a relação entre um grupo de variáveis, que podem ser controlados experimentalmente, e a resposta observada. É um modelo fatorial, onde gráficos de contorno são gerados por efeitos linear ou quadrático de variáveis chaves e a equação modelo é derivada com o ajuste dos dados experimentais e a resposta ótima do sistema é calculada (Rodrigues e Iemma, 2009; Brandão, 2012).

Segundo Rodrigues e Iemma (2009), o planejamento experimental representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. Esse objetivo maior pode ser dividido em outros objetivos de acordo com o propósito dos ensaios:

- determinar quais variáveis são mais influentes nos resultados;
- atribuir valores às variáveis influentes de modo a otimizar os resultados;
- atribuir valores às variáveis influentes de modo a minimizar a variabilidade dos resultados;
- atribuir valores às variáveis influentes de modo a minimizar a influência de variáveis incontroláveis.

A seguir, destacam-se alguns benefícios da utilização das técnicas estatísticas de planejamento experimental:

- ✓ redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação;

- ✓ estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos;
- ✓ determinação da confiabilidade dos resultados;
- ✓ realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios;
- ✓ seleção das variáveis que influem num processo com número reduzido de ensaios;
- ✓ representação do processo estudado através de expressões matemáticas;
- ✓ elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.

O planejamento experimental é uma ferramenta essencial no desenvolvimento de novos processos e no aprimoramento de processos em utilização. Um planejamento adequado permite, além do aprimoramento de processos, a redução da variabilidade de resultados, a redução de tempos de análise e dos custos envolvidos. No que se refere ao projeto de produtos, o planejamento experimental permite a avaliação e comparação de configurações (projetos) distintas, avaliação do uso de materiais diversos, a escolha de parâmetros de projeto adequados a uma ampla faixa de utilização do produto e à otimização de seu desempenho (Rodrigues e Iemma, 2009).

3.11 Transformada Z

A Transformada Z é uma importante transformada utilizada em análises de sistemas lineares, oferecendo vantagens significativas em relação aos processos no domínio de tempo. É modelada em sistemas físicos de tempo discreto com equações de diferenças lineares com coeficientes constantes; um exemplo é um filtro digital linear invariante no tempo. A transformada Z de uma equação de diferenças nos dá uma boa descrição das características da equação (modelo) e, por conseguinte, do sistema físico. Além disso, equações de diferenças transformadas são algébricas e, portanto, mais fáceis de manipulação e de resolução (Phillips *et. al*, 2008, Tonidandel, 2010).

É uma equação que expressa o valor de uma sequência $\{a_n\}$ como uma função do termo a_{n-1} que é chamado de equação de diferenças de primeira ordem. A equação de diferenças será resolvida se a função f tal que $a_n = f(n)$, $n = 1,2,3,...$, é conhecida (Sloughter, 2000). Esta equação expressa um valor de uma sequência como uma função dos outros termos, porém nem todas as aplicações começam com uma fórmula explícita para estes termos e é necessário apenas algumas relações entre os termos da sequência.

Exemplo: Suponha certa população de corujas que cresce a uma taxa de 2% ao ano. Se x_0 é a representação inicial da população de corujas e x_n o número de corujas n anos mais tarde, é dada pela Equação 1.1.

$$x_{n+1} = x_n + 0{,}02 * x_n = 1{,}02 * x_n \quad (1.1)$$

Para $n = 0,1,2,...$. Ou seja, o número de corujas em um determinado ano é igual ao número de corujas no ano anterior acrescido 2% do número de corujas do ano anterior. A Equação 1.1 é um exemplo de equação de diferenças de primeira ordem, que relaciona o número de corujas em um determinado ano com um número destas no ano anterior. Por isso, o valor de x_n é conhecido uma vez que é sabido o valor de x_{n-1}. Para obter a sequência iniciada, é necessário saber o valor de x_0. Se o número inicial de corujas é 100 e é requerida o número de corujas após 3 anos, então o valor encontrado é:

$$x_0 = 100;$$
$$x_1 = 1{,}02 * x_0 = 1{,}02 * 100 = 102;$$
$$x_2 = 1{,}02 * x_1 = 1{,}02 * 102 = 104{,}04;$$
$$x_3 = 1{,}02 * x_2 = 1{,}02 * 104{,}04 = 106{,}1208.$$

3.12 Modelos Cinéticos

Os modelos cinéticos de processos fermentativos utilizados para descrever a atividade microbiana podem ser classificados, quanto ao número de componentes usados na representação celular, em modelos não estruturados e em modelos estruturados. No primeiro modelo, o material celular é representado por uma única variável. No segundo modelo, as células são descritas com maiores detalhes, considerando, por exemplo, componentes intracelulares, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças do meio ambiente.

Estes modelos podem ainda ser classificados em dois grupos quanto à heterogeneidade da população microbiana em modelos não segregados e modelos segregados. Nos modelos não segregados, a população celular é considerada homogênea, isto é, todas as células apresentam o mesmo comportamento. Nos modelos segregados, as células são consideradas discretas, como indivíduos de uma população heterogênea, com distribuição de idade, tamanho e propriedades celulares (Schmidell *et. al*, 2001).

Não é possível a formulação de um modelo que inclua todas as características e detalhes celulares, sendo necessário, escolher o modelo cinético apropriado de acordo com sua complexidade e aplicação (Ferrari, 2013).

A velocidade instantânea de transformação é uma definição especial de velocidade que apresenta interesse em avaliar o desempenho de um processo fermentativo de acordo com a produtividade em biomassa (r_x), substrato (r_s) e produto (r_p) definidas pelas equações 1.2a, 1.2b e 1.2c. Os termos da equação mostram que a produtividade representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo total de fermentação.

$$r_X = \frac{dC_X}{dt} \qquad (1.2a)$$

$$r_S = \frac{dC_S}{dt} \qquad (1.2b)$$

$$r_P = \frac{dC_P}{dt} \qquad (1.2c)$$

A velocidade específica de transformação analisa os valores das velocidades instantâneas com relação à concentração de células. Devido ao fato da concentração de células aumentar durante um cultivo descontínuo, a concentração do complexo enzimático responsável pela transformação do substrato *S* no produto *P* aumenta. As equações (equações 1.3) das velocidades específicas de transformação de células (μ_x), de substratos (μ_s) e produtos (μ_p) são mostradas abaixo.

$$\mu_X = \frac{1}{C_X}\frac{dC_X}{dt} \qquad (1.3a)$$

$$\mu_S = \frac{1}{C_X}\frac{dC_S}{dt} \qquad (1.3b)$$

$$\mu_P = \frac{1}{C_X}\frac{dC_P}{dt} \qquad (1.3c)$$

Os fatores de rendimento (ou conversão) são dependentes do tempo *t* de cultivo e são relacionados com os valores correspondentes de *X*, *S* e *P* através dos fatores de conversão definidos pela equação 1.4.

$$Y_{x/s} = \frac{C_x - C_{xo}}{C_{So} - C_S} \quad (1.4a)$$

$$Y_{x/p} = \frac{C_x - C_{xo}}{C_P - C_{Po}} \quad (1.4b)$$

$$Y_{p/s} = \frac{C_p - C_{po}}{C_{so} - C_s} \quad (1.4c)$$

3.12.1 Modelos cinéticos para o crescimento da bactéria propostos na literatura

O estudo da cinética é de vital importância para a investigação de exopolissacarídeos produzidos em fermentações. Os modelos matemáticos que utilizam as cinéticas facilitam a análise de dados e podem fornecer uma estratégia de resolução de problemas encontrados no processo de fermentação. Um modelo analítico muito utilizado para a cinética de fermentações de polissacarídeos inclui variações temporais de biomassa, substrato e produto (Weiss e Ollis, 1980).

Existem vários modelos que representam o crescimento microbiano na literatura. O mais simples deles é o de Monod (1942), que faz uma relação entre velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_x) e substrato mostrado na equação 1.5.

$$\mu_x = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_s + C_S} \quad (1.5)$$

Sendo que μ_{max} é a velocidade máxima específica de crescimento e *Ks* a constante de desnaturação. Na equação de Monod, se *S*=*Ks*, então chega-se a equação 1.6.

$$\mu_x = \frac{\mu_{max}}{2} \quad (1.6)$$

Ou seja, o *Ks* é a concentração de substrato quando a velocidade específica de crescimento é a metade da máxima. No começo da fermentação, onde a concentração de substrato é alta, *S* é muito maior que *Ks*, e desta forma, a velocidade específica de crescimento atinge um valor máximo, e este valor perdura durante uma determinada fase do processo. Conforme o substrato limitante é consumido, μ se reduz com o tempo. Mesmo que este valor de velocidade específica máxima de crescimento seja calculado, na prática, este pode não ser alcançado. Os métodos para determinação deste parâmetro estão sujeitos a erros.

O modelo de Monod é análogo à equação de Michaelis-Menten para reações enzimáticas e tem sido universalmente empregado como modelo matemático para o crescimento celular. Entretanto, em muitos casos, com microrganismos pluricelulares e fermentação descontínua, os resultados previstos pela equação de Monod não apresenta boa concordância com os valores experimentais, por ser um modelo simples que não considera a inibição por substrato e produto (Da Silva, 1981; Schmidell *et. al*, 2001).

A equação logística de Verhulst, proposta no século XVIII, tem sido um modelo ilustrativo da dinâmica do crescimento em um habitat de recursos finitos. Esta equação baseia-se na noção de que a taxa de crescimento populacional, neste caso, o crescimento microbiano, em um ambiente é proporcional à população e a quantidade de recursos disponíveis para a sua utilização, a equação 1.7 é representada a seguir (Robazza *et. al*, 2010).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{máx} * X\left(1 - \frac{X}{X_{máx}}\right) \quad (1.7)$$

A equação de Leudeking-Piret (1959) apresenta bom ajuste para amplos tipos de fermentações, sendo que leva em conta termos de contribuição associado ou não ao crescimento mostrado na equação 1.8.

$$r_p = Y_{p/x} r_x + m_p X \quad (1.8)$$

Na equação 1.8, o primeiro e segundo termos podem ser interpretados com a produção de determinado produto desejado relacionado ao crescimento microbiano ($Y_{p/x}$) e biomassa existente (X) em função dos parâmetros do modelo (r_x e m_p) (Schmidell *et. al*, 2001).

3.12.2 Modelo cinético utilizado neste trabalho

O modelo cinético não estruturado e não segregado foi utilizado por Portela *et. al* (2008) para a modelagem e a produção de goma xantana utilizando caldo de cana como fonte de carbono. O modelo proposto expressou o crescimento e a formação do biopolímero como uma função somente da biomassa e da sua evolução com o tempo. Os modelos mais comumente utilizados são os modelos não estruturados e não segregados devido à simplicidade e à capacidade de representar os processos fermentativos reportados na literatura.

Os modelos cinéticos empregados, Equação de Verhulst-Pearl e Luedeking-Piret, seguem o modelo cinético não estruturado e não segregado para a produção de goma xantana proposto por Weiss e Ollis (1980) como foi descrito no trabalho de Portela *et. al* (2008).

3.13 Considerações finais

A goma xantana é produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* e é um importante biopolímero utilizada em diversas aplicações na indústria. A sua demanda no Brasil é grande e importada de vários países.

Baseados na literatura pode-se concluir que o Brasil apresenta tecnologia e matéria-prima para a produção desta em escala industrial. Pode-se utilizar inúmeros substratos alternativos com características distintas com o objetivo de diminuir os custos da produção, dar um destino adequado aos resíduos gerados na indústria e processamento das matérias-primas, além da produção da goma xantana com propriedades economicamente interessantes, como alto rendimento e viscosidade.

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção e Manutenção da bactéria *Xanthomonas campestris*

4.1.1 Obtenção da cepa da bactéria

A cepa da bactéria *X. campestris* (ATCC 13951) foi cedida pelo banco de cepas da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) André Tosello, Campinas - SP. Para o desenvolvimento deste trabalho, a cepa foi doada pelo professor Dr. Enio Nazaré de Oliveira Júnior do Programa de Pós Graduação em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável (PPGTDS) e do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO) do Campus Alto Paraopeba. A Figura 6 ilustra as colônias da bactéria vistas por microscópio óptico da marca Motic® modelo BA310.

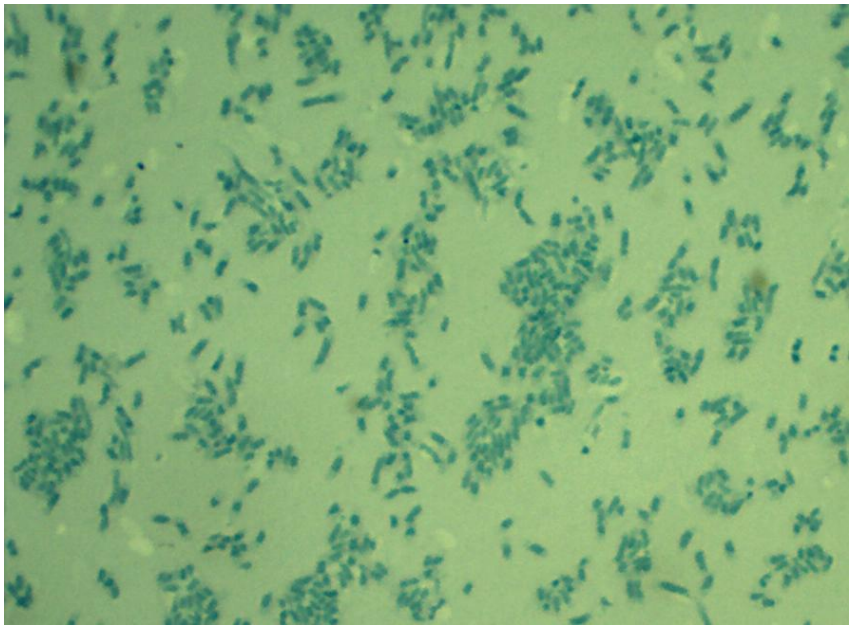


Figura 6. Representação da cepa da bactéria *X. campestris* utilizada para este trabalho (lente de aumento de 40x) (Fonte: Arquivo pessoal).

4.1.2 Manutenção da bactéria

Para a manutenção das cepas, a metodologia utilizada seguiu como descrito no trabalho de Nery *et. al* (2008) e Brandão (2012). Estas foram mantidas em meio YM líquido (Yeast Malt) contendo (m/v): glicose 1%; extrato de levedura 0,3%; extrato de carne 0,3%; peptona bacteriológica 0,5%. A esterilização do meio foi feita a 121°C por 15 minutos. A cepa foi inoculada no meio YM e introduzido glicerol 10%. As cepas foram mantidas em criotubos e foram guardados em freezer.

4.2 Preparo dos meios alternativos

4.2.1 Leite de mandioca

A mandioca necessária para o preparo do leite de mandioca foi comprada em um estabelecimento comercial na cidade de Ouro Branco - MG. O processo de obtenção do leite vegetal se inicia pela lavagem da raiz em água potável. Essa lavagem é feita para reduzir as sujeiras físicas do vegetal. Após a lavagem, aproximadamente 1 kg desta raiz foi descascada e cortada em pedaços menores e deixada imersa por 12 horas com aproximadamente 1 L.

Após este período a água foi descartada e adicionou-se o mesmo volume de água. Em seguida, a mistura de água e mandioca foi triturada em liquidificador doméstico de forma a obter uma mistura mais homogênea. A Figura 7 apresenta a mistura formada após a sua preparação.

Figura 7. Leite de mandioca preparado para ser utilizado como substrato alternativo (Fonte: arquivo pessoal).

4.2.2 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi doado de um estabelecimento comercial no centro da cidade de Ouro Branco – MG. O bagaço foi cortado em pedaços menores e armazenado no freezer.

4.2.3 Biomassa de malte

A biomassa de malte foi doada pelo professor Dr. Brener Magnabosco Marra do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del-Rei do campus Alto Paraopeba. A biomassa é proveniente da brassagem do malte utilizado para produção de cerveja *Blond Ale* desenvolvida no Laboratório de Tecnologia em Destilação e Fermentação (LADEF). Esta foi armazenada em geladeira a 4°C.

A biomassa foi deixada em estufa a 50°C, depois triturada, foi acrescentada água destilada e agitada em placa de aquecimento utilizando agitador magnético. A mistura foi filtrada utilizando peneira comercial e as soluções resultantes foram preparadas com concentrações de 3,2 $g.L^{-1}$ a 8,8 $g.L^{-1}$ de biomassa de malte triturada seguindo o planejamento experimental.

4.3 Caracterização dos substratos alternativos

Foram realizadas análises para a caracterização centesimal dos substratos alternativos: leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte, de forma a obter os teores de umidade, cinzas, dosagem de proteínas totais, lipídios totais e carboidratos para antes e após as 120 horas de fermentação.

4.3.1 Teor de umidade

Foi determinada pelo método de secagem em estufa a 105°C com circulação de ar, de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997). O ensaio foi feito em triplicata. Os cadinhos foram deixados secar previamente por 30 minutos e depois tiveram suas massas registradas. Foram acrescentados 40 mL das amostras contendo os meios alternativos e foram deixados na estufa até apresentar massa constante. Após esse tempo, o substrato seco teve sua massa registrada e a umidade determinada.

4.3.2 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550°C de acordo com a AOAC (1997), no qual foram utilizadas as amostras que haviam sido utilizadas

para o teor de umidade. Após a incineração, as amostras foram pesadas por gravimetria sendo possível determinar o teor de cinzas.

4.3.3 Dosagem de proteínas totais

O teor de proteínas contidas no leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte foi determinado conforme o método espectrofotométrico descrito por Lowry *et al*. (1951).

Para a dosagem de proteínas totais foi realizado uma curva padrão utilizando água destilada e BSA em diferentes volumes. Após a construção desta curva padrão foram realizadas as dosagens de proteínas para as amostras, onde foram acrescentados diferentes volumes de água e volume de amostra, conforme a concentração de proteínas das amostras e o volume final deveria ser igual a 200 µL. Foi adicionado o reagente E e os tubos foram deixados por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 200 µL de reagente de Foulin, a solução foi homogeneizada e as amostras foram deixadas no escuro por 30 minutos antes de medir as absorbâncias a 750 nm.

As amostras foram filtradas em papel filtro antes da dosagem de proteínas para que fiquem translúcidas para a leitura no espectrofotômetro.

O equipamento utilizado para as leituras de absorbância foi o espectrofotômetro da marca Bioespectro® modelo SSP-220. O experimento foi realizado em triplicata. A curva padrão e maiores detalhes da metodologia estão descritas no Anexo I.

4.3.4 Lipídios totais

Para a determinação dos lipídios, utilizou-se a técnica de extração de lipídios pelo método de Soxhlet (AOAC, 1997). Para isso, utilizou-se um volume de 300 mL do solvente acetona e foram pesadas amostras de 1 g de leite de mandioca (seco em estufa), bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte. Foram realizados 3 ciclos de extração, onde após essa etapa, o solvente contendo os lipídios extraídos foi totalmente evaporado utilizando o rotaevaporador da marca Marconi®, modelo Novus N1040, de forma que restou nos balões previamente secos e pesados, apenas os lipídios extraídos. Estes foram pesados e obteve-se a massa de lipídios contida nas amostras dos substratos analisados.

4.4 Produção de goma xantana em *shaker*

A metodologia utilizada neste item e nos itens 4.5, 4.6 e 4.7 seguiram como referência Brandão (2012).

4.4.1 Preparo do inóculo

O meio YM líquido utilizado para o inóculo foi composto por (m/v): glicose 1,0%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, com o pH ajustado para 7,0. Foram preparados frascos Erlenmeyers contendo 100 mL do meio para o inóculo. Os frascos foram esterilizados em autoclave a uma temperatura de 121°C por um período de 15 minutos. Os meios foram resfriados até temperatura ambiente. Após esta etapa, um criotubo de 2 mL de pré-inóculo, contendo os microrganismos foram transferidos para cada frasco. Os Erlenmeyers foram incubados em agitador orbital, 180 rpm, a 28°C ± 2°C por 24 horas.

4.4.2 Obtenção das variáveis e condições de produção de goma xantana

Para avaliar as variáveis e condições da produção de goma xantana foi realizado um planejamento estatístico Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) fracionado 2^2 com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios para os meios alternativos. De forma a comparar as variáveis do meio alternativo com o padrão foi necessário preparar dois ensaios utilizando como substrato a sacarose. A metodologia da superfície de resposta foi utilizada para determinar a influência das variáveis estudadas e obter as melhores composições do meio fermentativo.

O planejamento experimental consistiu de variar os volumes do meio alternativo %(v/v e m/v) e do inóculo %(v/v) para os 11 ensaios de forma que o volume de água fosse completado até o volume final. Este planejamento consistiu em utilizar os pontos axiais, os pontos máximos e mínimos e ainda os pontos centrais, de forma que fossem realizadas combinações destes pontos e obtivessem assim melhores resultados. Os ensaios de sacarose apresentaram a mesma concentração de volume de inóculo no ponto central dos meios alternativos. Todos os meios foram minimamente suplementados com o objetivo de fornecer fontes de nitrogênio, fósforo e potássio utilizando 0,01% (m/v) de uréia e 0,1% (m/v) de K_2HPO_4.

Após a preparação dos meios é necessário autoclavar e ajustar os pH utilizando NaOH 0,1 mol.L^{-1} ou ácido acético 1% (v/v). Após a produção dos meios, incluindo o padrão com sacarose, foram adicionados diferentes volumes de inóculo em cada Erlenmeyer de acordo com o planejamento. Estes foram realizados de maneira asséptica na capela de fluxo laminar, e posteriormente foram levados ao agitador orbital *shaker* da marca Nova Técnica®, refrigerado a 28°C ± 2°C a 200 rpm durante 120 horas para produzir a goma xantana.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia e no Laboratório Biotecnológico na UFSJ no campus Alto Paraopeba em Ouro Branco – MG. Para a análise da reologia foram utilizados os laboratórios de Análise Instrumental e o Laboratório de Fermentações do PPGDTS, também do mesmo campus.

4.5 Produção de goma xantana em Biorreator Coluna de Bolhas

O aumento de escala fermentativa foi proposta para analisar a produção de goma xantana utilizando biorreator Coluna de Bolhas em batelada com volume útil de 4,5 L. A definição do volume de inóculo e da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi estipulada pela melhor condição da produção em menor escala, *shaker*, no ponto central, 11,5 mL de inóculo e 2,0 g de bagaço. Foram retiradas amostras com intervalos de tempo menores nos dois primeiros dias e a cada 24 horas no restante dos dias, com o objetivo de estudar a produção (rendimento) de goma xantana.

Seriam necessários 494,5 mL de inóculo e 86,0 g de bagaço de cana-de-açúcar, porém não havia volume suficiente de inóculo, apenas 200 mL. Desta forma, houve uma redução de cerca de 60% desta variável e para que a proporção fosse mantida, houve também a redução da quantidade de bagaço utilizada. Foram então, utilizados 200 mL de inóculo e 34,7 g de bagaço.

A cepa da bactéria de *X. campestris* foi à mesma utilizada na menor escala. Os meios foram minimamente suplementados com 0,01% (m/v) de uréia e 0,1% (m/v) de K_2HPO_4. O pH foi ajustado para 7,0.

A aeração foi mantida em 5 vvm (volume de ar por volume de efluente por minuto) e a agitação não pode ser controlada, por ser um parâmetro controlado pela própria aeração e ser uma característica do biorreator Coluna de bolhas. A temperatura proposta foi de 28 ± 2°C por 120 horas. A Figura 8 apresenta o experimento realizado em biorreator Coluna de Bolhas.

Figura 8. Experimento para produção de goma xantana utilizando bagaço de cana-de-açúcar utilizando biorreator Coluna de Bolhas (Fonte: Arquivo pessoal).

4.6 Precipitação da goma xantana

Após o término das 120 horas de fermentação, foi necessário levar as soluções contendo goma xantana, bactéria, restos celulares, meio nutritivo, entre outros, para a centrifugação com rotação de 3500 rpm (1591 x g) por 20 minutos à 4°C, com o objetivo de sedimentar estas partículas em suspensão por ação da força da gravidade. A centrífuga utilizada foi uma refrigerada SL 701 da marca Solab®.

Após a centrifugação foi acrescentado álcool etílico 92,8° GL para a precipitação da goma em temperatura ambiente, por 1 hora. A proporção utilizada foi de 3:1 de etanol e meio fermentativo contendo goma xantana. Passado o tempo do processo, a goma flotada foi removida da solução através de filtração simples utilizando peneira comercial.

Terminada a precipitação as gomas xantanas foram levadas para a estufa a temperatura de 50°C por um período aproximado de 48 horas. Terminado este processo, os valores de rendimento foram obtidos por gravimetria.

4.7 Preparo das soluções para análise no viscosímetro

Preparou-se soluções em água destilada de 0,5% (m/v) de goma xantana produzida pela bactéria *X. campestris* com meio padrão de sacarose e meios alternativos (leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte) para a leitura no viscosímetro.

As soluções foram deixadas por 24 horas em repouso e em temperatura ambiente até sua leitura no viscosímetro de Brookfield com banho-maria acoplado.

4.7.1 Comportamento Reológico

Para a análise do comportamento reológico da goma xantana produzida pelo meio padrão e pelos meios alternativos, foram preparadas soluções com concentrações de 0,05% (m/v) de goma xantana nas melhores condições de cada ensaio em seus respectivos pontos centrais.

A metodologia de preparo das amostras foi o mesmo descrito anteriormente (item 4.7).

O comportamento reológico foi realizado a temperatura de 25°C e foram variados a velocidade de agitação em 10, 20, 30, 50, 60 e 100 rpm.

4.8 Transformada Z aplicada em bioprocesso

Foi proposta a metodologia da Transformada Z para a modelagem da produção de goma xantana utilizando meio alternativo, bagaço de cana-de-açúcar. Para esta modelagem, primeiramente, foi utilizado um balanço de massa em biorreator batelada e em biorreator contínuo e em seguida, foi aplicada Transformada Z pela equação de diferenças. Foram obtidas as equações plano de estado para a biomassa (*Cx*), substrato (*Cs*) e produto (*Cp*). Decidiu-se utilizar este meio alternativo nas simulações visto que este seria o utilizado também no experimento em Biorreator Coluna de Bolhas.

Os dados foram obtidos através da cinética desenvolvida para os tempos 0, 2 e 4 horas de inoculação.

A sacarose presente no bagaço de cana-de-açúcar e nas amostras retiradas durante a cinética foram hidrolisadas para obter glicose e frutose. Esta hidrólise foi determinada acrescentando-se 1 mL de ácido clorídrico 2 N em 1 mL de amostra de

sacarose. A solução foi aquecida entre 65°C e 70°C por 10 minutos, resfriada em água corrente e foram adicionados 3 mL de solução de hidróxido de sódio 1 N (Faria, 2009).

Após a hidrólise, a concentração de glicose pôde ser obtida pelo método enzimático utilizando o kit glicose-oxidase da marca Doles® para avaliar o consumo de fonte de carbono durante a fermentação (Portela *et. al*, 2008).

A produção e precipitação do biopolímero para esta cinética seguiu como descrito em 4.4 a 4.7. Foram obtidos os dados de *Cx*, *Cs*, *Cp* e dos parâmetros experimentais para a aplicação da Transformada Z e dos modelos cinéticos.

O balanço de massa em um biorreator é dado pela equação (2.1).

$$F.X_0 - F.X + \mu.X.V = V.\frac{dx}{dt} \quad (2.1)$$

Sendo, F é a vazão em $L.h^{-1}$ e será considerada 0 $L.h^{-1}$ (reator batelada sem entrada) e 0,1 $L.h^{-1}$ (reator contínuo); X é a concentração de células em $g.L^{-1}$ e esta variará com o tempo; X_0= 0,4 $g.L^{-1}$e é a concentração de células inicial; μ é a velocidade específica de crescimento e será utilizado 0,49 h^{-1}; V é o volume do reator e é igual a 4,5 L.

Aplicando a Equação de Diferenças da Transformada Z no balanço de massa no biorreator, tem-se:

$$F.X_n - F.X_0 + \mu.X_n.V = V.(X_{n+1} - X_n) \quad (2.1a)$$

$$F.X_n - F.X_0 + \mu.X_n.V = V.X_{n+1} - V.X_n \quad (2.2a)$$

Rearranjando a equação e a dividindo pelo volume, tem-se:

$$X_{n+1} = \frac{F.X_n}{V} - \frac{F.X_0}{V} + \mu.X_n + X_n \quad (2.3a)$$

Colocando X_n em evidência, logo:

$$X_{n+1} = X_n\left[\frac{F}{V} + \mu + 1\right] - \frac{F.X_0}{V} \quad (2.4a)$$

Para o substrato, tem-se a equação abaixo:

$$\frac{ds}{dt} = -\alpha * \frac{dx}{dt} - \beta * X \quad (2.1b)$$

Aplicando a Equação das Diferenças, tem-se:

$$S_{n+1} - S_n = -\alpha * (X_{n+1} - X_n) - \beta * X_n \quad (2.2b)$$

Esta equação é resolvida do mesmo modo que na equação anterior, para a biomassa. Logo,

$$S_{n+1} = X_n \left[-\frac{\alpha.F}{V} - \alpha.\mu - \beta \right] + S_n + \frac{\alpha.F.X_0}{V} \qquad (2.3b)$$

Da mesma forma que foi desenvolvida para a biomassa e o substrato, uma simples álgebra é requerida para a resolução da equação do produto.

Para o produto, tem-se a sua equação:

$$\frac{dP}{dt} = m * \frac{dx}{dt} + \lambda * X \quad (2.1c)$$

Aplicando a Equação das Diferenças, tem-se:

$$P_{n+1} - P_n = m * (X_{n+1} - X_n) + \lambda * X_n \quad (2.2c)$$

E obtém-se a equação plano de estado:

$$P_{n+1} = X_n \left[\frac{m.F}{V} + m.\mu + \lambda \right] + P_n - \frac{m.F.X_0}{V} \qquad (2.3c)$$

Como o substrato possui uma concentração inicial de 0,44 $g.L^{-1}$ foi necessário obter-se a equação plano de estado discreta para o sistema a partir das equações (2.3a), (2.3b) e (2.3c), obtendo-se desta forma a matriz plano de estado dada por 2.4.

$$\begin{bmatrix} X_{(n+1)} \\ S_{(n+1)} \\ P_{(n+1)} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{F}{V} + \mu + 1 & 0 & 0 \\ -\beta - \frac{F}{V} * \alpha - \frac{\mu}{V} * \alpha & 1 & 0 \\ \frac{F}{V} * m + \frac{\mu}{V} * m - \lambda & 0 & 1 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} X_{(n)} \\ S_{(n)} \\ P_{(n)} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} -\frac{F}{V} \\ \frac{F}{V} * \alpha \\ -\frac{F}{V} * m \end{bmatrix} * [X_0] \quad (2.4)$$

Com as equações plano de estado obtidas para cada variável, utilizou-se o programa Simulink do MatLab® para as simulações.

4.9 Modelo Cinético aplicado em bioprocesso

O modelo cinético não estruturado e não segregado foi utilizado por Portela *et. al* (2008) para a modelagem e a produção de goma xantana utilizando caldo de cana como fonte de carbono. O modelo proposto expressou o crescimento e a formação do biopolímero como uma função somente da biomassa e da sua evolução com o tempo.

Para a modelagem do biopolímero foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar como meio alternativo. A metodologia para a produção e precipitação da goma xantana foi à mesma utilizada para os demais ensaios descritos anteriormente, itens 4.4 a 4.7. A determinação quantitativa de sacarose também foi utilizada neste ensaio como retratado no item 4.8. Esta cinética foi realizada de 0 a 48 horas, em pequenos intervalos de tempo, em média de 2 em 2 horas no início, de 6 em 6 horas no meio e de 24 horas ao final do processo. As amostras foram retiradas e analisadas para a determinação das concentrações de *Cx*, *Cp* e *Cs*. Obteve-se com a cinética os parâmetros experimentais do modelo de Weiss importantes na modelagem desta como α, λ e β, encontradas nas equações (2.6) e (2.7).

As metodologias utilizadas para a determinação da massa seca e os modelos cinéticos empregados, Equação de Verhulst-Pearl e Luedeking-Piret, neste trabalho seguiram o modelo cinético não estruturado e não segregado para a produção de goma xantana proposto por Weiss e Ollis (1980) como foi descrito no trabalho de Portela *et. al* (2008).

Para a massa seca, o mosto foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos à 4°C para ocorrer a separação das células. O pellet formado durante a centrifugação continha as células no meio e estas foram lavadas com solução salina 0,85% para completa eliminação dos componentes do meio e dos metabólitos, e foram levadas novamente para a centrífuga. A solução salina foi então descartada e a quantificação celular foi feita através da massa seca a 90°C ± 1°C, em estufa até peso constante.

Foi acrescentado ao sobrenadante etanol na proporção de 3:1 para a recuperação de goma xantana (*Cp*). O meio resultante com etanol foi então recuperado utilizando rotaevaporador para a recuperação apenas do meio fermentado (*Cs*).

Foram utilizados recursos computacionais com o software MatLab® para a modelagem do biopolímero e para os ajustes do modelo.

Weiss e Ollis (1980) expressaram o crescimento da biomassa pela utilização da equação de Verhulst-Pearl (Equação 1.6 e 2.5). O modelo investigado nesse estudo para a formação de produto e consumo de substrato é dado pelas equações de Luedeking-Piret (Equação 2.6 e 2.7). β e λ são parâmetros do modelo. Então, o modelo de Weiss e Ollis composto por equações de Verhulst-Pearl e Luedeking-Piret é dado por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{máx} * X\left(1 - \frac{X}{X_{máx}}\right) \quad (2.5)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\alpha * \frac{dX}{dt} - \beta * X \quad (2.6)$$

Sendo $\alpha = \frac{1}{Y_{x/s}}$

$$\frac{dP}{dt} = m * \frac{dX}{dt} + \boldsymbol{\lambda} * X \quad (2.7)$$

Sendo $m = \frac{1}{Y_{x/p}}$

Sendo que *X*, *S* e *P* referem-se à célula, substrato e produto:

$\mu_{máx}$ – velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

$X_{máx}$ – concentração celular máxima ($g.L^{-1}$);

m – produto associado ao crescimento celular (g_{xant}/g_{cel});

λ – produto não-associado ao crescimento celular ($g_{xant}/g_{cel}.h$);

α – consumo de substrato devido ao crescimento celular (g_{sac}/g_{xant});

β – consumo de substrato para manutenção celular ($g_{sac}/g_{cel}.h$).

Foram utilizados os modelos cinéticos proposto por Portela *et. al* (2008) e pela Equação de Monod, Equação 2.8, de forma a comparar estes modelos com os dados experimentais e encontrar o que melhor se ajusta.

$$\frac{dX}{dt} = \mu * X \quad (2.8)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos meios alternativos

Os meios fermentativos consistem geralmente de 2 a 4% de glicose ou sacarose como fonte de carbono, 0,05 a 0,1% de nitrogênio, fósforo e traços de outros minerais e resultam em uma conversão de 50 a 70% da fonte de carbono em goma xantana. Em geral, os processos industriais procuram utilizar meios que disponibilizem condições tanto para o crescimento quanto para o acúmulo de goma, sendo necessário a suplementação de nitrogênio livre, como a uréia e fósforo no meio como o fosfato de potássio dibásico, K_2HPO_4 (Rottava, 2005; Brandão *et al.*, 2008).

Neste caso, tanto o meio padrão de sacarose como os alternativos foram suplementados com a mesma concentração de fósforo e nitrogênio a fim de facilitar a comparação entre eles e para que o processo não sofra qualquer alteração, tendo como diferença apenas as suas composições centesimais.

A composição centesimal dos meios de fermentação pode ser representada pelo teor de umidade, teor de cinzas (sais minerais resultantes do processo de umidade), lipídios totais, dosagem de proteínas totais e carboidratos. O teor de carboidratos é resultante da subtração dos demais parâmetros (citados acima), pois são componentes essenciais para o meio de crescimento de microrganismos.

Os valores médios da caracterização físico-química das amostras dos meios alternativos para a produção de goma xantana são representados na Tabela 1 e Tabela 2 para antes e após a fermentação, respectivamente.

A composição centesimal do caldo de cana de Brandão *et al.* (2008) consistiu de 81% de umidade, 0,19% de cinzas, 0,74% de lipídio, 1,55% de proteína bruta e 16,52% de carboidratos. Alguns teores são diferentes dos encontrados no presente trabalho pelo fato do substrato utilizado ser o bagaço de cana-de-açúcar e a sua composição química ser variável em relação ao clima, variedade, propriedades físicas e químicas do solo, entre outros.

Tabela 1. Caracterização físico-química dos meios alternativos leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte antes e após as 120 horas de fermentação para a produção de goma xantana

	Antes da fermentação			**Após a fermentação**		
Parâmetros	**Leite de mandioca (%)**	**Bagaço de cana-de-açúcar (%)**	**Biomassa de malte (%)**	**Leite de mandioca (%)**	**Bagaço de cana-de-açúcar (%)**	**Biomassa de malte (%)**
Teor de umidade	97,48 ±0,03	77,72 ± 2,10	82,45 ±1,40	99,30 ±0,20	92,38 ± 1,00	88,60 ±0,32
Teor de cinzas	0,19 ±0,001	2,03 ±2,70	5,34 ±0,30	0,13 ±0,03	2,60 ±0,10	4,36 ±0,15
Lipídios totais	1,30	5,70	2,77	4,26	1,81	0,76
Proteína (Lowry)	0,41±0,04	0,35 ± 0,04	0,25 ± 0,04	0,25 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,17 ± 0,03
Carboidratos	0,62	14,2	9,19	-*	2,97	6,11

*resultado inconsistente

Os resultados para a composição centesimal de biomassa de malte não foi condizente com Menezes (2013), que possui 96,55% de umidade, 0,40% de cinzas, 0,77% de proteínas, 0,76% de lipídios, 1,75% de carboidratos e 0,23% de lignina. Os teores encontrados para o mesmo substrato foi de 82,45% de umidade, 5,34% de cinzas, 2,77% de lipídios, 0,25% de proteínas e 9,32% de carboidratos. Esta discrepância pode ter ocorrido devido à biomassa de malte ter passado por diferentes processamentos e ser proveniente de outro local de cultivo.

Não foi possível a obtenção das análises centesimais do leite de mandioca após as 120 horas de fermentação. Os teores de umidade, cinzas, lipídios totais e dosagem de proteínas totais foram superiores a 100% sem a presença dos carboidratos. Desta forma, houve algum problema ou alteração nos resultados do teor de carboidratos, então foi omitido na análise após as 120 horas de fermentação.

Pode-se notar que o teor de umidade para os meios alternativos aumentam depois da fermentação. Isto pode ocorrer pelo fato dos meios terem suas composições diminuídas e alteradas, ou seja, consumidas pelo microrganismo durante a fermentação.

Os substratos alternativos utilizados apresentaram teores de carboidratos inferiores quando comparado ao estudo realizado por Brandão *et. al* (2008) que utilizaram caldo de cana como substrato no processo fermentativo com 16,52% de

carboidratos e realizados por Nery *et. al* (2008) que utilizaram soro de leite com baixos teores de carboidratos, 3,4% e mesmo em baixas concentrações o biopolímero foi produzido, porém acredita-se que a produção tenha sido desfavorecida.

Estes compostos têm grande importância considerando a utilização dos mesmos como substratos na fermentação pelas bactérias *Xanthomonas*, uma vez que irão fazer parte dos nutrientes tanto para o crescimento celular como para a biossíntese de goma xantana durante o processo fermentativo. A fim de melhorar a produção do polissacarídeo, pode-se fazer a suplementação de outros nutrientes ou até mesmo de carboidratos.

5.2 Preparo das soluções para análise no viscosímetro

5.2.1 Comportamento reológico

Para a análise e comparação do comportamento reológico da goma xantana produzida pelo meio padrão e pelos meios alternativos foram preparadas soluções com concentrações menores das utilizadas, 0,05% (m/v) devido a quantidades reduzidas de amostras nas melhores condições de cada ensaio em seus respectivos pontos centrais.

Estudos anteriores desenvolvidos por Costa (2014) utilizando soro de leite como substrato alternativo foram realizados para analisar o comportamento reológico da goma xantana na concentração de 0,5% (m/v), foram variadas as temperaturas de 25, 35, 45, 55, 65, 75 e 85°C e as velocidade de agitação de 10, 20, 30, 50, 60 e 100 rpm. Este estudo indicou que a temperatura mais adequada para a viscosidade aparente é a temperatura de 25°C, como pode ser visualizada na Figura 9.

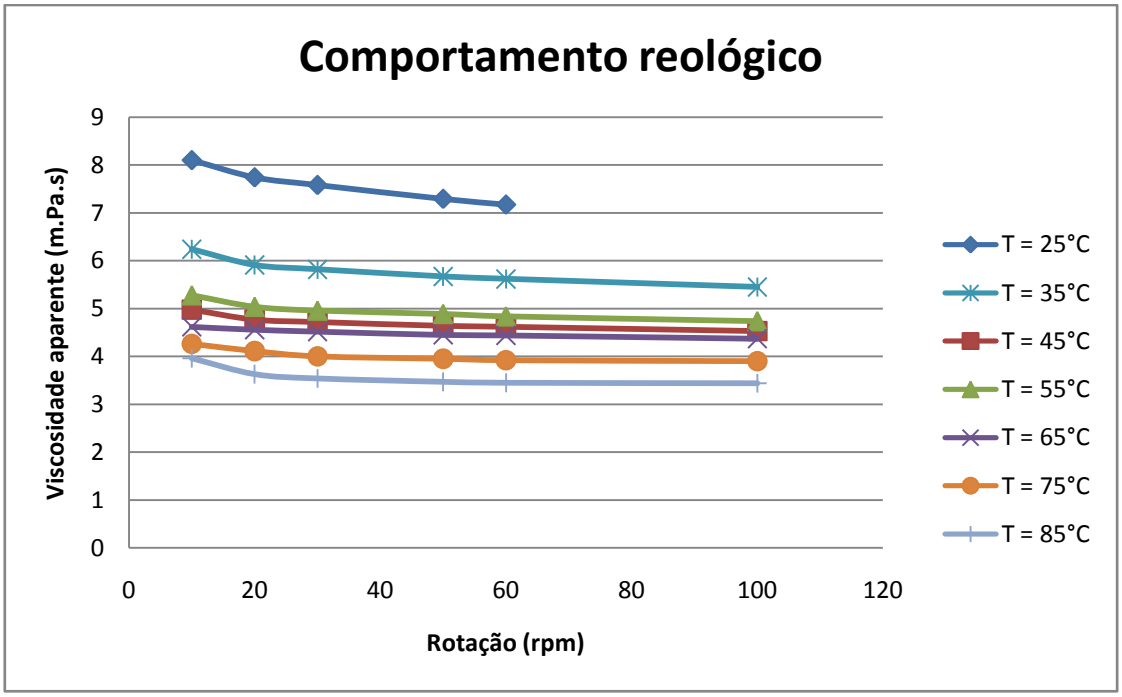


Figura 9. Comportamento reológico da goma xantana produzida pelo meio alternativo soro de leite com concentração de 0,5% (m/v) submetidas as temperaturas de 25, 35, 45, 55, 65, 75 e 85°C (Costa, 2014).

À temperatura de 25°C nem todas as viscosidades puderam ser obtidas em maiores rotações, pois estes valores foram muito altos e o equipamento não pôde fazer a análise, já que ultrapassou o limite de medição deste.

Desta forma, utilizou-se a temperatura de 25°C para realizar a análise de comportamento reológico dos meios padrão e alternativos, onde foi variado apenas as velocidades de rotação de 10, 20, 30, 50, 60 e 100 rpm. A Figura 10 apresenta o comportamento reológico deste experimento.

A goma xantana possui comportamento pseudoplástico, ou seja, a sua viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação do fluido. Esta é uma característica muito desejada em diversas situações. Para representar o comportamento reológico desta, utilizou-se o polissacarídeo produzido em *shaker* com a sacarose e os meios, leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte nos melhores valores obtidos dos experimentos e em seus pontos centrais.

Com o aumento da temperatura a goma xantana sofre transição de estrutura mais enovelada para uma estrutura mais linear. A estrutura mais linear invade outras linhas de corrente e por isso diminui a viscosidade e com isso, aumenta a resistência do escoamento.

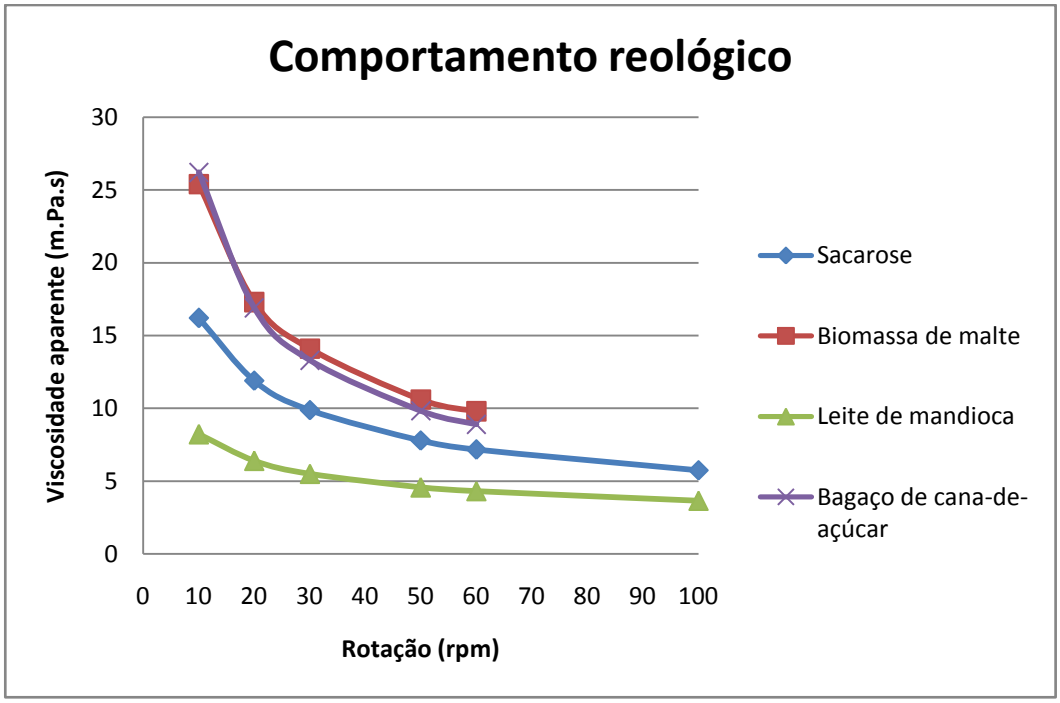


Figura 10. Comportamento reológico da goma xantana produzida pelos meio padrão e meios alternativos com concentração de 0,05% (m/v) submetidas as velocidades de rotação de 10, 20, 30, 50, 60 e 100 rpm.

As soluções aquosas de goma xantana foram realizadas em menores concentrações, 0,05% (m/v), do que para o meio alternativo soro de leite. Isto ocorreu, devido à falta de polissacarídeo para a realização na concentração de 0,5% (m/v), já que este experimento foi realizado posteriormente às análises de cada substrato alternativo.

As xantanas sintetizadas pela cepa da bactéria *Xanthomonas* produzidas pelos meios alternativos leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, biomassa de malte e meio padrão de sacarose apresentaram viscosidades aparentes entre 3,65 (m.Pa.s) a 8,22 (m.Pa.s); 8,9 (m.Pa.s) a 26,2 (m.Pa.s); 9,8 (m.Pa.s) a 25,4 (m.Pa.s) e 7,16 (m.Pa.s) a 16,2 (m.Pa.s), respectivamente, com taxa de cisalhamento de 10 rpm a 100 rpm.

A goma xantana produzida com bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte apresentou maior viscosidade aparente utilizando menor concentração de solução do biopolímero, enquanto a goma produzida a partir do leite de mandioca apresentou menor viscosidade aparente.

A xantana produzida a partir da sacarose pode possuir maior viscosidade do que as provenientes dos meios alternativos, em concentrações maiores (0,5% (m/v)) e em outros processos fermentativos. Observamos que a sacarose possuía maior viscosidade

quando comparada com os substratos alternativos, porém as velocidades de rotação foram menores, cerca de 0,3 a 1,0 rpm.

5.3 Processo de produção da goma xantana

Para a produção da goma xantana utilizando a cepa da bactéria *Xanthomonas campestris* com meio padrão de sacarose e meios alternativos de leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte em *shaker*, utilizou-se o planejamento estatístico DCCR fracionado 2^2 com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, com um total de 11 ensaios. No planejamento foi proposto a variação da concentração de meio alternativo %(v/v e m/v) e da concentração de inóculo %(v/v).

As variáveis dos planejamentos estatísticos analisados, volume de inóculo e concentração de substrato alternativo foram analisados pelo diagrama de Pareto, tabelas das estimativas dos efeitos, Tabela de Análise de Variância (ANOVA) e a análise da superfície de resposta. A metodologia da Superfície de resposta foi utilizada para determinar a influência das variáveis estudadas e obter a composição do meio fermentativo.

O tratamento dos dados foi realizado utilizando-se o software Statistica® v.7.0. Após alguns experimentos realizados, decidiu-se incluir uma nova variável de resposta determinada de produtividade que foi obtida através da razão da viscosidade pelo rendimento.

5.3.1 Leite de mandioca

Dois ensaios preliminares foram realizados utilizando o leite de mandioca como meio alternativo para a produção de goma xantana. Os substratos utilizados foram mandioca amarela e branca, respectivamente.

Para os 11 ensaios dos dois experimentos foram variados os volumes de leite de mandioca e de inóculo, consistindo para a primeira variável, ponto mínimo de 50 mL e máximo de 80 mL. O ponto mínimo para o inóculo foi de 10 mL e máximo de 20 mL. Os volumes de água foram completados até chegar o volume final. Os pH foram corrigidos para pH 7, pois os leites de mandioca amarela possuem meio ácido em torno de 4,50 e 4,60 e pH de 6,8 a 7 para a branca. O microrganismo utilizado foi a bactéria *X. campestris*.

Após as 120 horas de fermentação, foi realizado a precipitação dos biopolímeros produzidos pelo meio padrão e pelo meio alternativo, utilizando álcool na proporção de 3:1 para o meio fermentativo. Os resultados dos rendimentos do primeiro ensaio bem como os valores das variáveis estudadas (reais e codificados) se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento experimental variando porcentagem de inóculo (% v/v), porcentagem de leite de mandioca (% v/v) e os rendimentos obtidos

Ensaios	**Inóculo (% v/v)**	**Leite de mandioca (% v/v)**	**Volume de água (mL)**	**Rendimento ($g.L^{-1}$)**
1	-1 (11,5)	-1 (54,0)	34,5	0,41
2	-1 (11,5)	+1 (76,0)	12,5	2,36
3	+1 (18,5)	-1 (54,0)	27,5	0,86
4	+1 (18,5)	+1 (76,0)	5,5	53,94
5	-1,41 (10,0)	0 (65,0)	25,0	70,17
6	+1,41 (20,0)	0 (65,0)	15,0	87,87
7	0 (15,0)	-1,41 (50,0)	35,0	74,54
8	0 (15,0)	+1,41(80,0)	5,0	117,450
9	0 (15,0)	0 (65,0)	20,0	66,43
10	0 (15,0)	0 (65,0)	20,0	75,83
11	0 (15,0)	0 (65,0)	20,0	-

Apesar de alguns ensaios apresentarem altos valores de rendimento, os resultados encontrados não são adequados. Ocorreram problemas no *shaker* que se encontrou instável em relação à temperatura e agitação, pois o equipamento não apresentava controle destas variáveis. A temperatura do equipamento permaneceu em torno de 35ºC e de acordo com García-Ochoa *et al*., (2000) a temperatura ótima para a produção do biopolímero é em torno de 28ºC. Não foi possível obter um controle da agitação e desta forma, o ensaio 11 foi perdido.

As xantanas produzidas a partir do substrato alternativo leite de mandioca apresentaram um aspecto quebradiço e fibroso. Pelos experimentos realizados observou-se que os biopolímeros produzidos com sacarose apresentam características de não serem fibrosas e sim gelatinosas. Acredita-se que o alto rendimento do polissacarídeo e a sua característica rígida é devido ao amido, que está presente na goma a partir do

substrato alternativo e está sendo carregado junto à xantana causando um falso rendimento, como se pode ser observado na Figura 11.

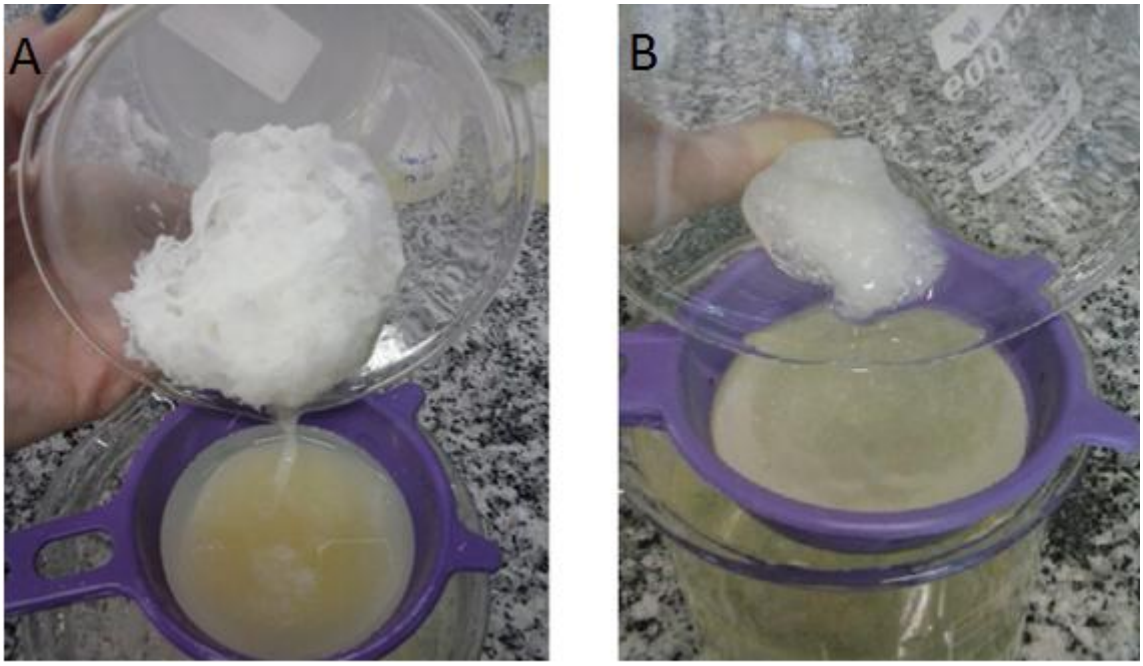


Figura 11. Comparação entre as gomas xantanas (a) leite de mandioca e (b) sacarose (Fonte: arquivo pessoal).

A solução do leite de mandioca decanta facilmente, sendo necessária a realização de filtração para a retirada de nutrientes solúveis e insolúveis em excesso, principalmente o amido.

Para este experimento, foi possível obter apenas a variável rendimento resultante da fermentação. A variável viscosidade não pode ser determinada pelo fato do biopolímero não se solubilizar em água no preparo das soluções para a análise da reologia, mesmo sob agitação e temperatura.

Os resultados da variável rendimento estão apresentados pela superfície de resposta na Figura 12. Nota-se que para este experimento encontram-se os melhores rendimentos com maiores concentrações de leite de mandioca e de inóculo.

Apesar dos problemas ocasionados no equipamento *shaker*, pode-se avaliar as próximas etapas experimentais a serem realizadas. Desta forma, decidiu-se por alterar os níveis, pontos mínimos, máximos, axiais e centrais, das duas variáveis utilizadas, leite de mandioca e inóculo.

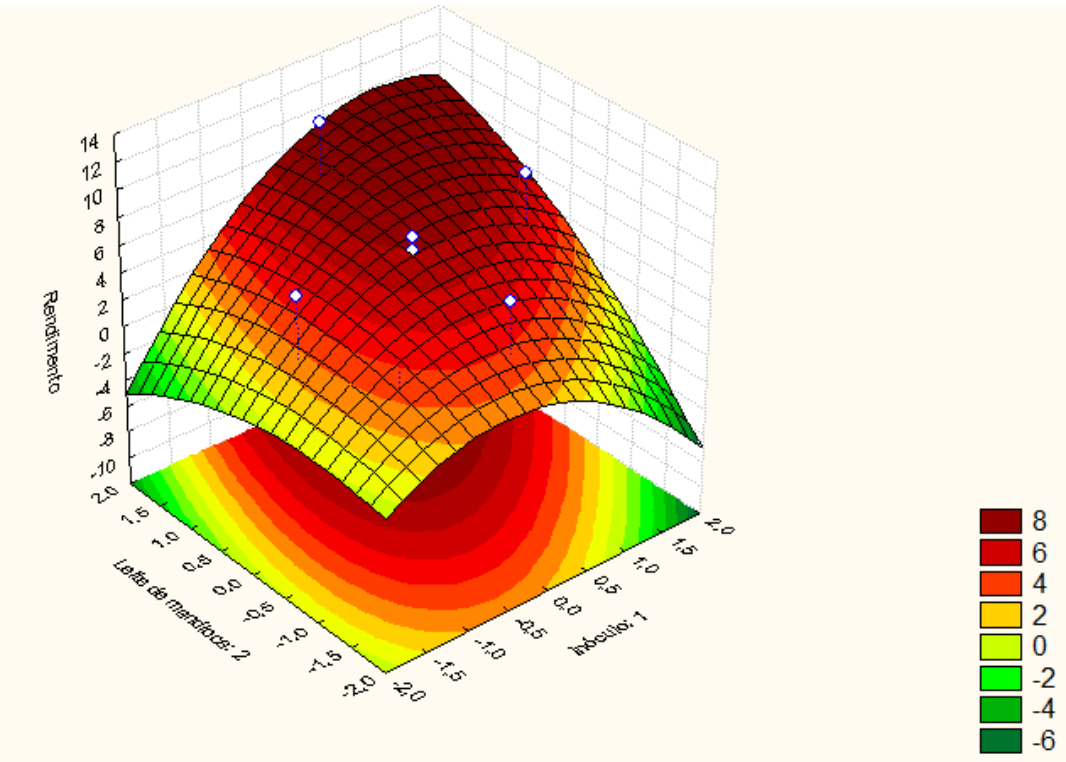


Figura 12. Superfície de resposta com o comportamento do rendimento da goma xantana em relação à concentração de leite de mandioca e inóculo.

O segundo experimento apresentou as mesmas características do primeiro e dessa forma, os resultados não serão apresentados.

A fim de se constatar a presença de amido nas soluções e nos biopolímeros produzidos, fez-se o teste de amido. Este consistiu de levar as soluções para a centrífuga durante 20 minutos a 3500 rpm (1591 x g) e depois os tubos foram deixados em repouso por 30 minutos. Após este tempo adicionou-se 4 gotas de lugol em cada tubo contendo as soluções a serem analisadas. Foi realizado um controle (branco) onde utilizou-se água ao invés da solução de goma xantana. A solução controle apresentou coloração marrom (iodo). Através dos resultados obtidos, observou-se que todos os meios apresentaram amido devido à coloração preto-azulado, indicando a presença de amido.

Percebeu-se que o leite vegetal apresenta decantação de nutrientes após curto período. Desta forma, a solução encontrada foi à filtração manual utilizando uma peneira comercial para a retirada de excessos de materiais insolúveis.

Com isso, o leite de mandioca apresenta menos fibras, amido e outros nutrientes solúveis e insolúveis, de forma a simular as condições dos resíduos da indústria provenientes do processamento da mandioca.

Os leites de mandioca amarela e branca foram filtrados e fez-se o teste de diluição (v/v) 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4, de forma a encontrar a melhor razão do meio alternativo para a produção do biopolímero. Após a fermentação, as soluções com os testes foram preparadas para a análise da viscosidade. Os resultados dos rendimentos e das viscosidades se encontram na Tabela 3.

Tabela 3. Valores dos rendimentos ($g.L^{-1}$) e das viscosidades (cP) das diluições dos leites de mandioca, amarela e branca

	Rendimento ($g.L^{-1}$)		**Viscosidade 1 rpm (cP)**	
Ensaios	**Amarela**	**Branca**	**Amarela**	**Branca**
1:1	3,55	5,46	79,80	93,60
1:2	2,82	3,73	121,80	287,0
1:3	2,18	2,95	192,60	273,5
1:4	2,07	2,17	245,90	331,1

Percebeu-se que o leite de mandioca branca apresentou maior rendimento para as diluições 1:1 e 1:2, e as maiores viscosidades também foram para a mandioca branca para as diluições 1:2 e 1:4. Desta forma, estabeleceu-se que a diluição empregada seria a 1:2 para os demais ensaios experimentais.

Um novo experimento foi realizado com o leite de mandioca (branca) utilizando a diluição 1:2 como substrato alternativo para comparação com o meio padrão de sacarose para os ensaios realizados.

A Tabela 4 apresenta o planejamento experimental e as variáveis dependentes (rendimento, viscosidade e produtividade) obtidas no experimento. Nesta tabela a variável leite de mandioca já está diluída na proporção 1:2.

Com as variáveis viscosidade e rendimento analisadas pode-se obter agora a uma nova variável de resposta: a produtividade. Esta variável foi determinada pela Equação (3.1):

$$Produtividade = \frac{Viscosidade}{Rendimento} \qquad (3.1)$$

Tabela 4. Planejamento experimental variando porcentagem de inóculo (%v/v) e porcentagem de leite de mandioca (% v/v), rendimento ($g.L^{-1}$), viscosidade (cP) a 1 rpm e produtividade ($cP.L.g.^{-1}$)

Ensaios	**Inóculo (% v/v)**	**Leite de mandioca (% v/v)**	**Rendimento ($g.L^{-1}$)**	**Viscosidade (cP)**	**Produtividade ($cP.L.g^{-1}$)**
1	-1 (8,0)	-1 (65)	2,37	108,0	45,57
2	-1 (8,0)	+1 (85)	2,85	69,6	24,42
3	+1 (15,0)	-1 (65)	2,49	93,0	37,35
4	+1 (15,0)	+1 (85)	2,94	83,4	28,37
5	-1,41 (6,6)	0 (75)	2,51	93,6	37,29
6	+1,41 (16,4)	0 (75)	2,79	67,2	24,09
7	0 (11,5)	-1,41 (61)	2,37	100,2	42,28
8	0 (11,5)	+1,41(89)	3,08	53,4	17,34
9	0 (11,5)	0 (75)	3,17	513,2	161,89
10	0 (11,5)	0 (75)	2,71	482,9	178,19
11	0 (11,5)	0 (75)	3,62	542,2	149,78

O rendimento da goma xantana produzida pela cepa da bactéria *X. campestris* utilizando meio padrão de sacarose e meio alternativo de leite de mandioca foi obtido por gravimetria após a precipitação. Como observado na Tabela 4, os biopolímeros que apresentaram maior rendimento foram a partir dos ensaios 2, 4, 6, 8, 9, 10 e 11. Isto pode ter ocorrido pelo fato das condições de processo nestes meios ter sido mais favoráveis durante a fermentação.

O rendimento médio encontrado para os ensaios foi de 2,81 $g.L^{-1}$ e a produtividade (razão viscosidade pelo rendimento) média encontrada para os substratos alternativos foi de 67,87 $cP.L.g^{-1}$.

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 13), nenhum dos parâmetros avaliados (concentração de leite de mandioca e concentração de inóculo) foram estatisticamente significativos nestas condições dentro dos resultados de confiança

(p<0,05). Estes parâmetros causam pouca influência no processo, porém podem possuir maior influência sob outras condições. A Tabela 5 apresenta a Tabela de ANOVA.

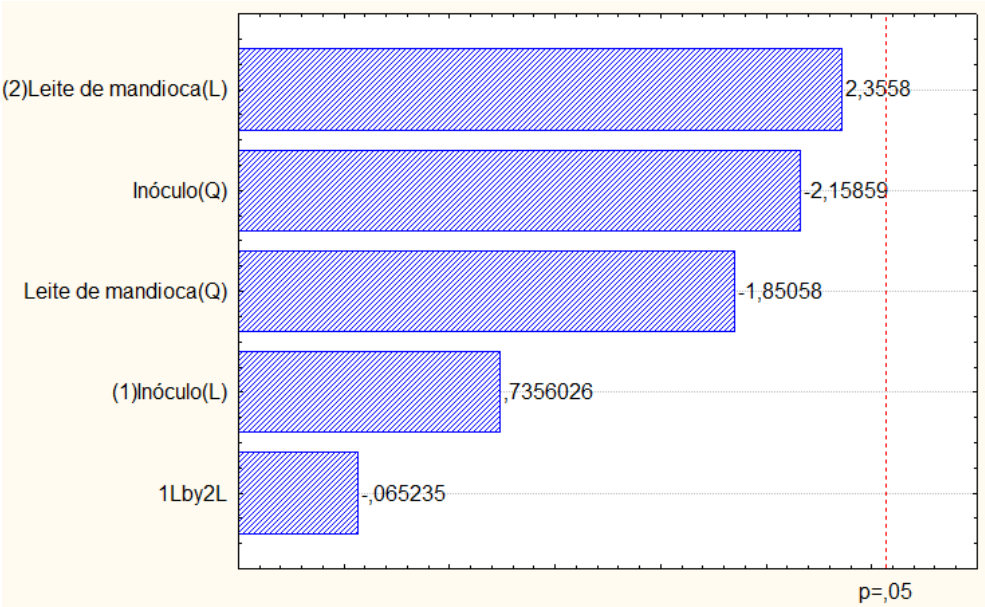


Figura 13. Diagrama de Pareto com o comportamento da produção de goma xantana pela cepa 13951.

Tabela 5. Valores da ANOVA para o rendimento da goma xantana pela cepa 13951

Parâmetro	GL	SQ	QM	F calc	P-value
Vol. Soro (L)	1	0,045901	0,045901	0,541111	0,495009
Vol. Soro (Q)	1	0,395256	0,395256	4,659497	0,083336
Inóculo (L)	1	0,470779	0,470779	5,549794	0,065090
Inóculo (Q)	1	0,290507	0,290507	3,424652	0,123456
Vol. Soro x Inóculo	1	0,000361	0,000361	0,004256	0,950514
Resíduo	5	0,424141	0,084828		
Total	10	1,473681			

Ftab(1;9;0,05) = 5,117 e Fcalc= 31,27.

GL= graus de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, F calc = F calculado.

A partir dos dados obtidos pela ANOVA foi possível fazer o cálculo do teste F, a fim de garantir que os dados obtidos estão dentro da estatística com nível de confiança de 95%. O valor de F é calculado pela divisão entre os quadrados médios (QM) para o

modelo e os quadrados médios residuais. A Tabela 5 demonstra que o Fcalc é maior que o Ftab (F tabelado) sendo assim, os dados são estatisticamente significativos. Isto pode ser facilmente visualizado na Figura 14 através da superfície de resposta, onde os resultados encontrados estão muito próximos do ponto central.

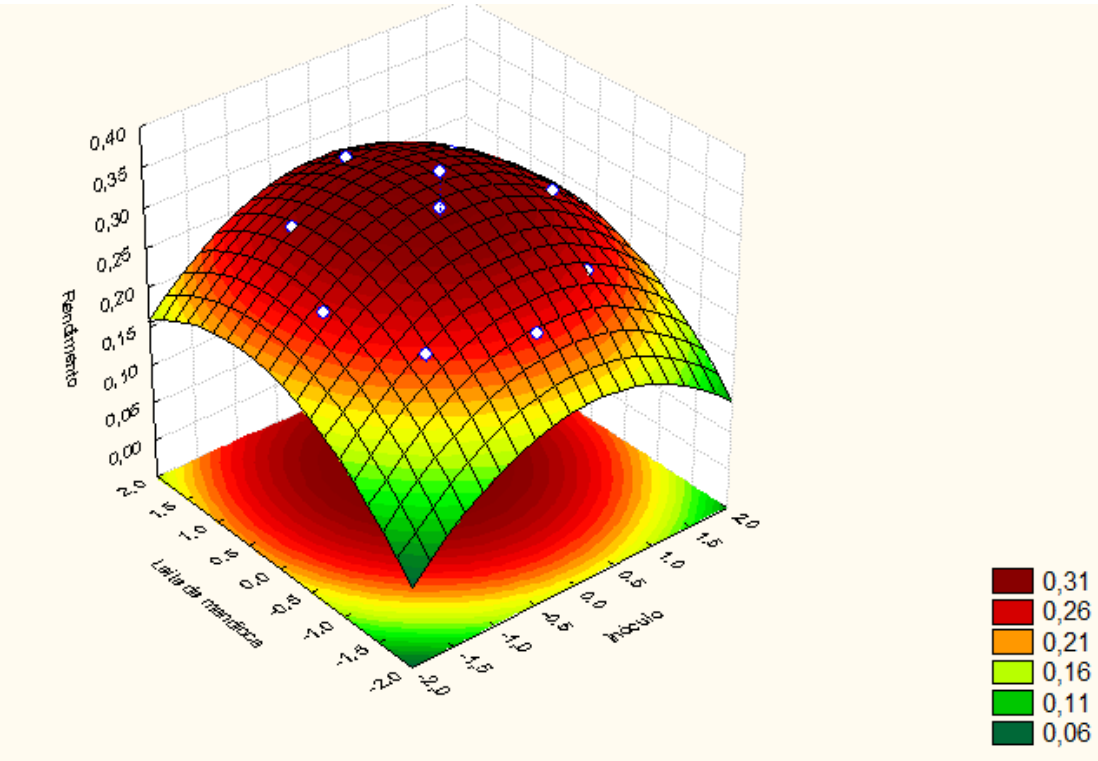


Figura 14. Superfície de resposta com o comportamento do rendimento da goma xantana em relação à concentração do volume de leite de mandioca e de inóculo.

Com os dados obtidos, pôde-se obter a equação do modelo estudado (Equação 3.2a).

$$Rendimento = 3{,}167 + 0{,}0757x_1 - 0{,}265x_1^2 + 0{,}243x_2 - 0{,}227x_2^2 - 0{,}00950x_1x_2$$

(3.2a)

sendo,

x_1: concentração de leite de mandioca;

x_2: concentração de inóculo.

Soluções aquosas de goma xantana utilizando leite de mandioca branca foram preparadas com concentração de 0,5% (m/v) conforme dito anteriormente no item 4.7.

Nota-se que os pontos centrais dos ensaios apresentaram maior viscosidade. O fato destes ensaios possuírem viscosidades maiores que os outros, pode ter sido

ocasionado pelas condições oferecidas para a bactéria que produziu gomas com maior massa molar.

Observa-se na superfície de resposta obtida ilustrada na Figura 15, a partir do modelo empírico que o ponto ótimo está em torno do ponto central.

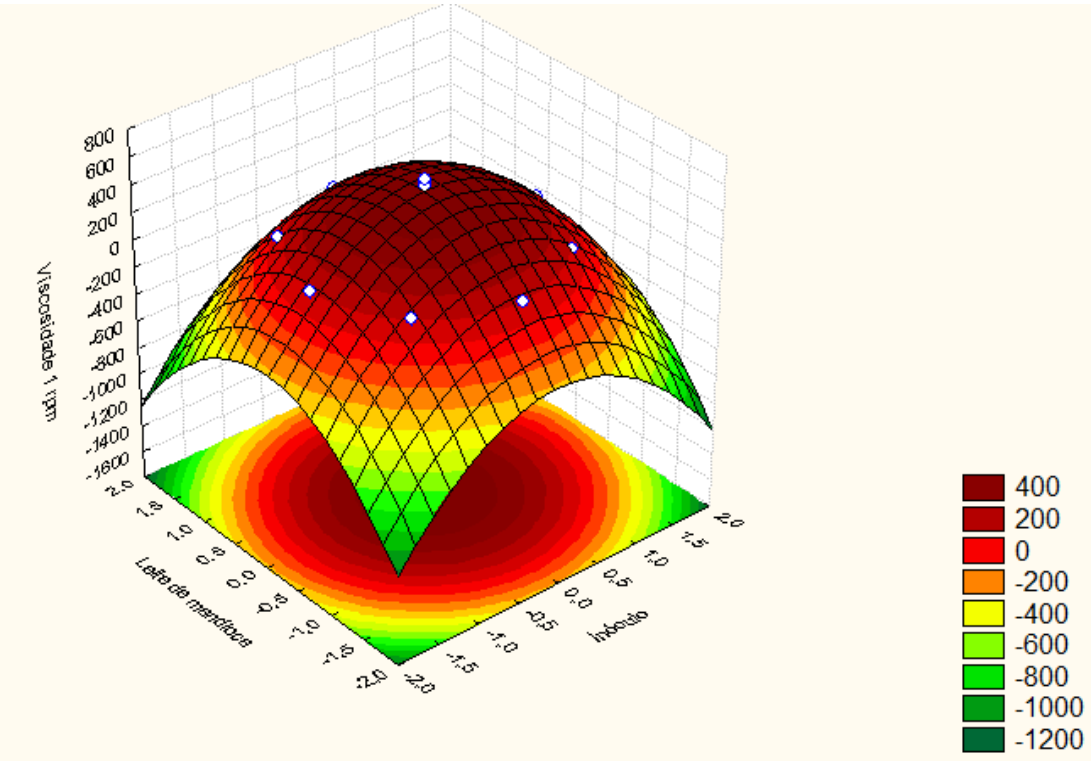


Figura 15. Superfície de resposta com o comportamento da viscosidade aparente da goma xantana em relação à concentração do volume de leite de mandioca e de inóculo.

O diagrama de Pareto (Figura 16) e a Tabela 6 podem ser analisados a fim de se estudar os níveis de confiança ($p<0,05$) das variáveis estudadas durante o processo.

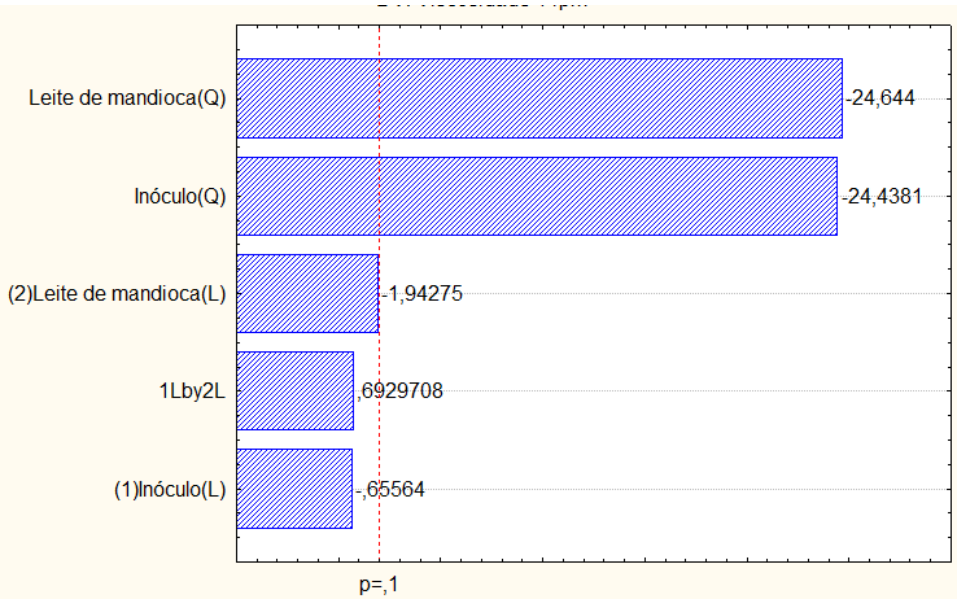


Figura 16. Diagrama de Pareto com o comportamento da viscosidade de goma xantana em relação ao volume de leite de mandioca e inóculo.

Para a viscosidade aparente o volume de leite de mandioca e de inóculo possuem valores significativos nestas condições dentro dos resultados de confiança ($p<0,05$). Estes influenciam o processo de forma negativa, ou seja, a medida que os níveis mudam do menor ponto (negativo) para o maior (positivo) este apresenta uma viscosidade menor.

Através da Tabela 8 obtém-se o valor de F calculado e comparando com o F tabelado obtém-se que os resultados são estatisticamente significativos dentro do limite de confiança do experimento, 95%.

A equação do modelo para a viscosidade foi obtida e apresentada na Equação 3.2b.

$$Viscosidade = 512,75 - 4,817x_1 - 213,7x_1^2 - 14,273x_2 - 215,5x_2^2 + 7,2x_1x_2$$

(3.2b)

sendo

x_1: concentração de leite de mandioca;

x_2: concentração de inóculo.

Tabela 6. Valores da ANOVA para a viscosidade aparente da goma xantana pela cepa 13951 em relação à concentração do volume de leite de mandioca e inóculo

Parâmetro	GL	SQ	QM	F calc	P-value
Vol. Soro (L)	1	185,6	185,6	0,42299	0,541020
Vol. Soro (Q)	1	257888,1	257888,1	597,2226	0,000002
Inóculo (L)	1	1629,8	1629,8	3,7743	0,109684
Inóculo (Q)	1	262250,8	262250,8	607,3258	0,000002
Vol. Soro x Inóculo	1	207,4	207,4	0,4802	0,519191
Resíduo	5	2159,1	431,8		
Total	10	406113,3			

Ftab(2;8;0,05) = 4,46 e Fcalc= 748,4

As variáveis rendimento e viscosidade nem sempre seguem o mesmo comportamento. Desta forma, a fim de não haver perdas na produção e de se estabelecer melhores condições e equilíbrio, determinou-se uma nova variável de resposta, denominada produtividade (Equação 3.1), já mostrada anteriormente.

O diagrama de Pareto (Figura 17) e a Tabela 7 podem ser analisados a fim de se estudar os níveis de confiança ($p<0,05$) das variáveis estudadas durante o processo.

O Diagrama de Pareto indica que para a variável produtividade, o volume de leite de mandioca e de inóculo possuem valores significativos nestas condições dentro dos limites de confiança ($p < 0,05$). Isto pode ser comprovado através da Tabela 7.

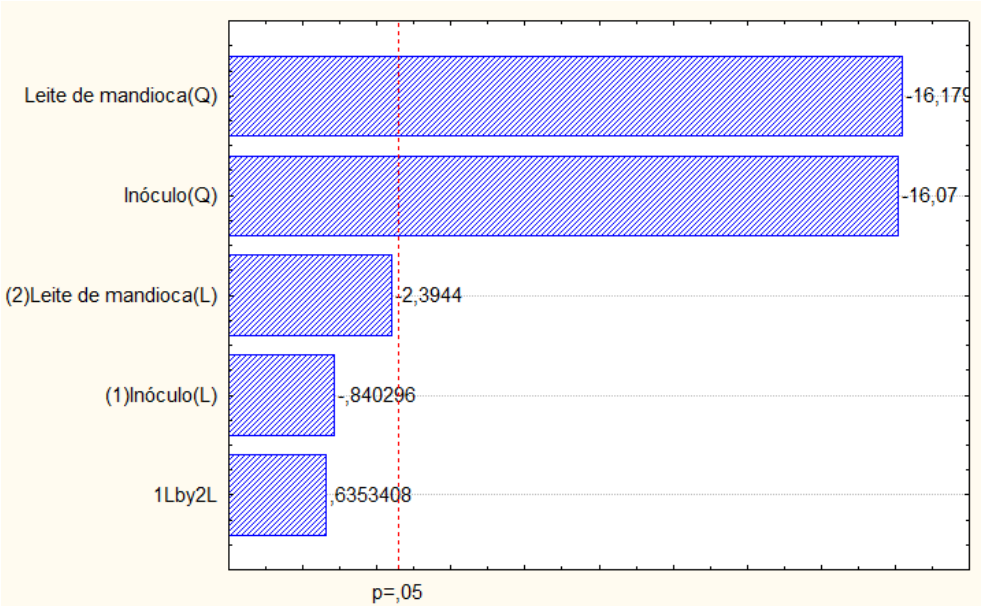


Figura 17. Diagrama de Pareto com o comportamento da produtividade de goma xantana em relação ao volume de leite de mandioca e inóculo.

Tabela 7. Valores da ANOVA para a produtividade aparente da goma xantana pela cepa 13951 em relação à concentração do volume de leite de mandioca e inóculo

Parâmetro	GL	SQ	QM	F calc	P
Inóculo (L)	1	65,99	65,99	0,7061	0,439065
Inóculo (Q)	1	24134,37	24134,37	258,2438	0,000017
Leite de mandioca (L)	1	535,80	535,80	5,7332	0,062049
Leite de mandioca (Q)	1	24463,87	24463,87	261,7695	0,000016
Vol. Leite x Inóculo	1	37,72	37,72	0,4037	0,553141
Resíduo	5	467,28	93,46		
Total	10	38660,34			

Ftab(2;8;0,05) = 4,46 e Fcalc= 326,9

A partir dos dados obtidos da Tabela de ANOVA, foi possível fazer o cálculo do teste F e compará-lo com o F tabelado. O resultado encontrado indica que os resultados do modelo são confiáveis e apresentam significado estatístico para o modelo.

Com os valores encontrados para a variável produtividade foi possível obter a superfície de resposta. Pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos com os valores próximos ao ponto central, como pode ser visto pela Figura 18.

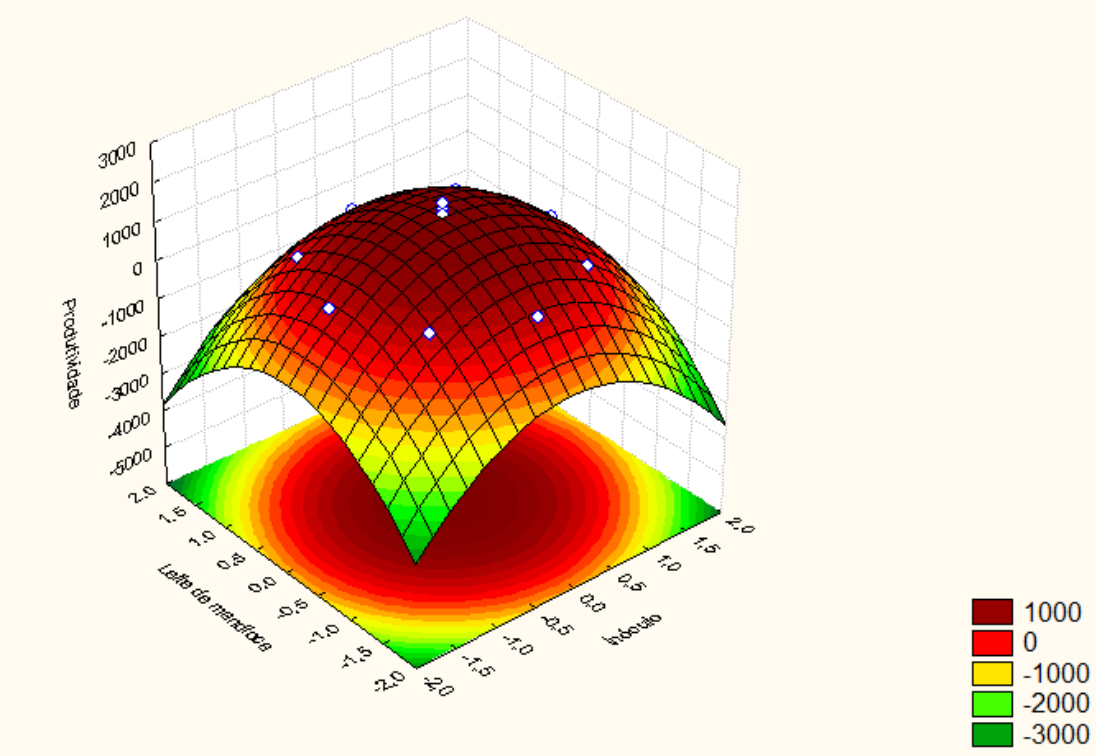


Figura 18. Superfície de resposta com o comportamento da produtividade da goma xantana em relação à concentração do volume de leite de mandioca e de inóculo.

Para a variável produtividade, o volume de leite de mandioca e de inóculo possuem valores significativos nestas condições dentro dos limites de confiança ($p<0,05$). Pode-se observar pela Figura 18 que para altas e baixas concentrações destas variáveis há uma baixa produtividade. Deste modo, o ideal é trabalhar em concentrações em torno do ponto central com valores em torno de 11,5 mL de inóculo e 75,0 mL de leite de mandioca.

A equação da produtividade foi obtida através dos dados, com isso, percebe-se que as variáveis quadráticas (leite de mandioca e inóculo) estudadas apresentaram significado estatístico, enquanto as demais apresentaram pouca influência no processo, mas foram consideradas para a equação do modelo (Equação 3.2c).

$$Produtividade = 1632{,}787 - 2{,}8720x_1 - 65{,}3743x_1^2 - 8{,}1838x_2 - 65{,}8190x_2^2 + 3{,}0710x_1x_2 \quad (3.2c)$$

sendo

x_1: concentração de leite de mandioca;

x_2: concentração de inóculo.

A proposta do trabalho foi à otimização das condições operacionais da produção de goma xantana avaliando as três variáveis, rendimento, viscosidade e produtividade. Deste modo, conclui-se que para o substrato leite de mandioca foi possível obter a sua otimização da produção utilizando 11,5 mL de inóculo e 75,0 mL do leite vegetal.

De acordo com Gowdhaman *et al.*, 2013, a produção máxima de goma xantana utilizando bagaço de mandioca com ácido cítrico (4,4 $g.L^{-1}$) foi de 20,82 $g.L^{-1}$. Enquanto que neste trabalho a maior produção foi de 3,62 $g.L^{-1}$ utilizando leite de mandioca como substrato alternativo. Vale ressaltar que as condições de processo de produção e os substratos utilizados foram diferentes ocasionando assim rendimentos distintos de biopolímeros.

5.3.2 Bagaço de cana-de-açúcar

Ensaios preliminares foram realizados com o objetivo de utilizar o bagaço de cana-de-açúcar como meio alternativo para a produção do biopolímero, goma xantana. O microrganismo utilizado foi o mesmo dos experimentos anteriores, a cepa 13951.

Para os ensaios descritos na Tabela 10 foram variados as concentrações do bagaço de cana-de-açúcar e do volume de inóculo, consistindo para a primeira variável, ponto mínimo de 8,5 $g.L^{-1}$ e máximo de 11,5 $g.L^{-1}$. O ponto mínimo para o inóculo foi de 2,0 mL e máximo de 3,0 mL. Os volumes de água foram completados até o volume final de 100,0 mL. Os pH foram corrigidos para pH 7. A Tabela 8 apresenta as variáveis reais e codificadas das variáveis do processo.

Os resultados foram obtidos por gravimetria logo após a precipitação e a secagem dos biopolímeros. Pela Tabela 8 foi possível calcular a média dos rendimentos que foi de 0,76 $g.L^{-1}$ e os ensaios que apresentaram maiores rendimentos foram 5, 7, 9 e 10. Isto pode ter ocorrido pelo fato das condições experimentais nestes meios terem sido mais favoráveis para a bactéria durante a fermentação.

Tabela 8. Planejamento experimental utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de biopolímero, resultados obtidos das variáveis rendimento ($g.L^{-1}$), viscosidade (cP) a 5 rpm e produtividade do experimento ($cP.L.g^{-1}$)

Ensaios	**Inóculo (% v/v)**	**Bagaço de cana-de-açúcar (% m/v)**	**Rendimento ($g.L^{-1}$)**	**Viscosidade (cP)**	**Produtividade ($cP.L.g^{-1}$)**
1	-1 (8,5)	-1 (2,0)	0,66	164,4	249,09
2	-1 (8,5)	+1 (3,0)	0,73	139,2	190,68
3	+1 (11,5)	-1 (2,0)	0,58	311,9	537,76
4	+1 (11,5)	+1 (3,0)	0,65	239,9	369,08
5	-1,41 (7,9)	0 (2,5)	0,96	260,3	271,15
6	+1,41 (12,1)	0 (2,5)	0,46	130,8	284,35
7	0 (10,0)	-1,41 (1,8)	0,85	260,3	306,24
8	0 (10,0)	+1,41 (3,2)	0,82	136,8	166,83
9	0 (10,0)	0 (2,5)	0,92	194,4	211,30
10	0 (10,0)	0 (2,5)	0,96	255,5	266,15

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 19), nenhum dos parâmetros foram estatisticamente significativos nestas condições dentro dos resultados de confiança ($p<0,05$). A Tabela 9 apresenta os valores de F calculado e F tabelado que são relevantes para o processo.

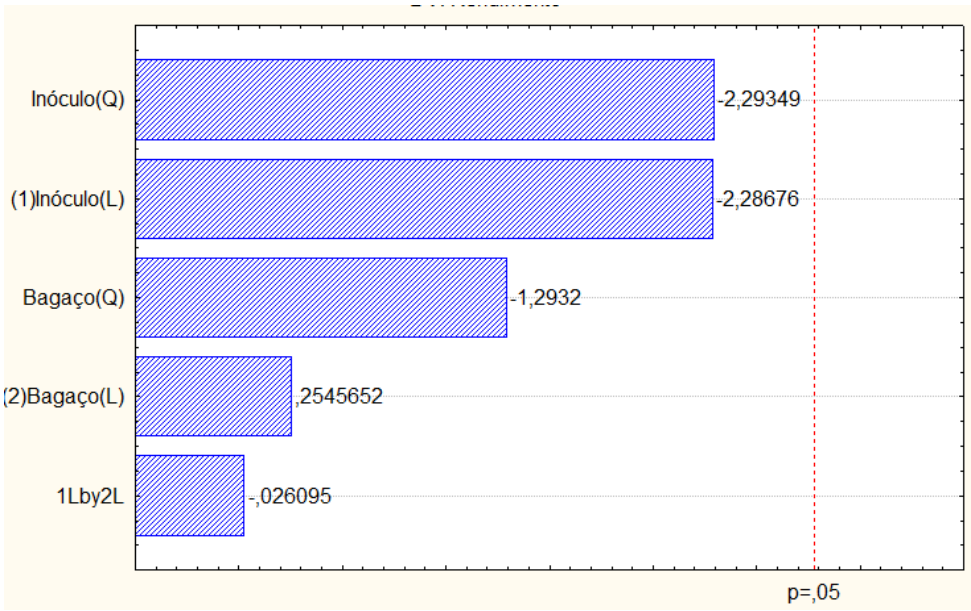


Figura 19. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável rendimento da produção de goma xantana utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo.

Tabela 9. Valores da ANOVA para o rendimento da goma xantana pela cepa 13951

Parâmetro	GL	SQ	QM	F calc	P-value
Inóculo (Q)	1	0,094629	0,094629	5,260098	0,083535
Bagaço (L)	1	0,001166	0,001166	0,064803	0,811611
Bagaço (Q)	1	0,030086	0,030086	1,872371	0,265572
Inóculo x Bagaço	1	0,000012	0,000012	0,000681	0,980432
Resíduo	4	0,071960	0,017990		
Total	9	0,263962		0,0384004	0,014392

Ftab(1;8;0,05) = 5,318 e Fcalc= 29,34

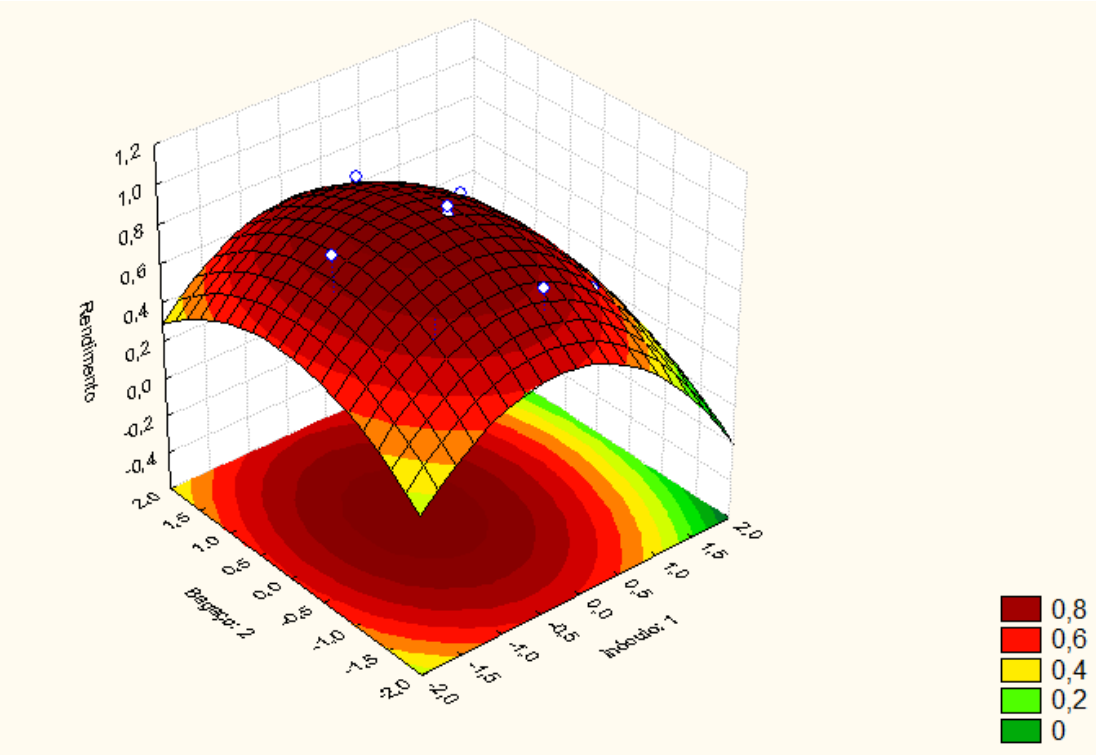


Figura 20. Superfície de resposta da variável rendimento da goma xantana em relação à concentração do bagaço de cana-de-açúcar e de volume de inóculo.

A superfície de resposta apresenta resultados próximos do ponto central. Com os dados obtidos, pôde-se obter a equação do modelo estudado (Equação 3.3a).

$$Rendimento = 0{,}94 - 0{,}108x_1 - 0{,}144x_1^2 + 0{,}0121x_2 - 0{,}0811x_2^2 - 0{,}00175x_1x_2$$

(3.3a)

sendo,

x_1: concentração de inóculo;

x_2: concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

Após a análise de rendimento, foi necessário a realização da variável viscosidade com rotação de 0,5 rpm. De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 21) e a Tabela 10, nenhum dos parâmetros foram estatisticamente significativos nestas condições dentro dos resultados de confiança ($p<0{,}05$). Estes parâmetros causam pouca influência no processo, porém podem possuir maior influência sob outras condições. Isto pode ser facilmente visualizado na Figura 22 através da curva de contormo.

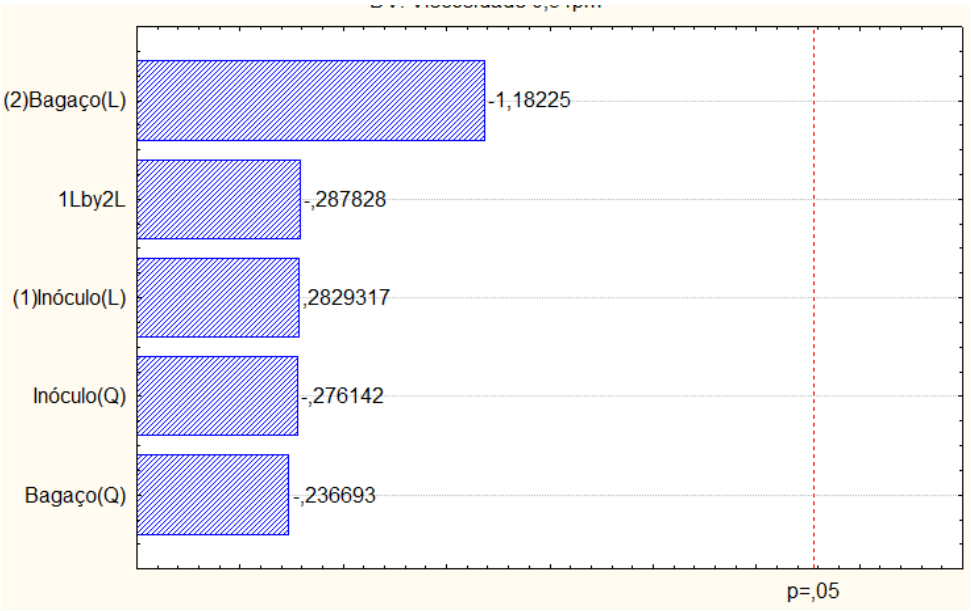


Figura 21. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável viscosidade da solução de goma xantana a concentração de 5,0% (m/v) pela cepa 13951.

Tabela 10. Valores da ANOVA para a variável viscosidade da goma xantana pela cepa 13951

Parâmetro	GL	SQ	QM	F calc	P-value
Inóculo (L)	1	529,09	529,09	0,080050	0,791267
Inóculo (Q)	1	504,00	504,00	0,076254	0,796119
Bagaço (L)	1	9238,17	9238,17	1,397719	0,302583
Bagaço (Q)	1	370,29	370,29	0,056024	0,824522
Inóculo x Bagaço	1	547,56	547,56	0,056024	0,824522
Resíduo	4	26437,85	6609,462		
Total	9	37370,07			

Ftab(1;8;0,05) = 5,318 e Fcalc= 11,31

Pela Tabela 13 foi possível fazer o cálculo do teste F e este foi significativo para o nível de confiança de 95%, pois o F calculado foi superior ao F tabelado. Logo, os dados obtidos apresentam importância e podem ser utilizados nas análises sem oferecer dúvida do estudo.

A Figura 22 apresenta a superfície de resposta do experimento através do modelo empírico. Observa-se que os pontos centrais apresentam valores razoáveis para

a variável viscosidade e os melhores resultados correspondem aos ensaios 3 e 7, que se encontram na região mais escura da superfície de resposta.

Nota-se que os pontos com maiores resultados da variável viscosidade foram os que apresentam níveis entre 0 e +1 para a variável inóculo e com níveis mais baixos -1 e -α para a variável bagaço de cana-de-açúcar. O fato de alguns ensaios possuírem viscosidades maiores que os outros, pode ter sido ocasionado por melhores condições, como na menor concentração de bagaço oferecidas para a bactéria que sintetizou e produziu gomas com maior massa molar.

O ideal seria o deslocamento dos níveis das variáveis concentração de bagaço e de inóculo para a produtividade, de modo a ocorrer a otimização das variáveis. A variável bagaço de cana-de-açúcar pode ser deslocada de modo a permanecer no seu ponto central (0) com 2,5% (m/v), assim como o inóculo (0) com 10,0 mL.

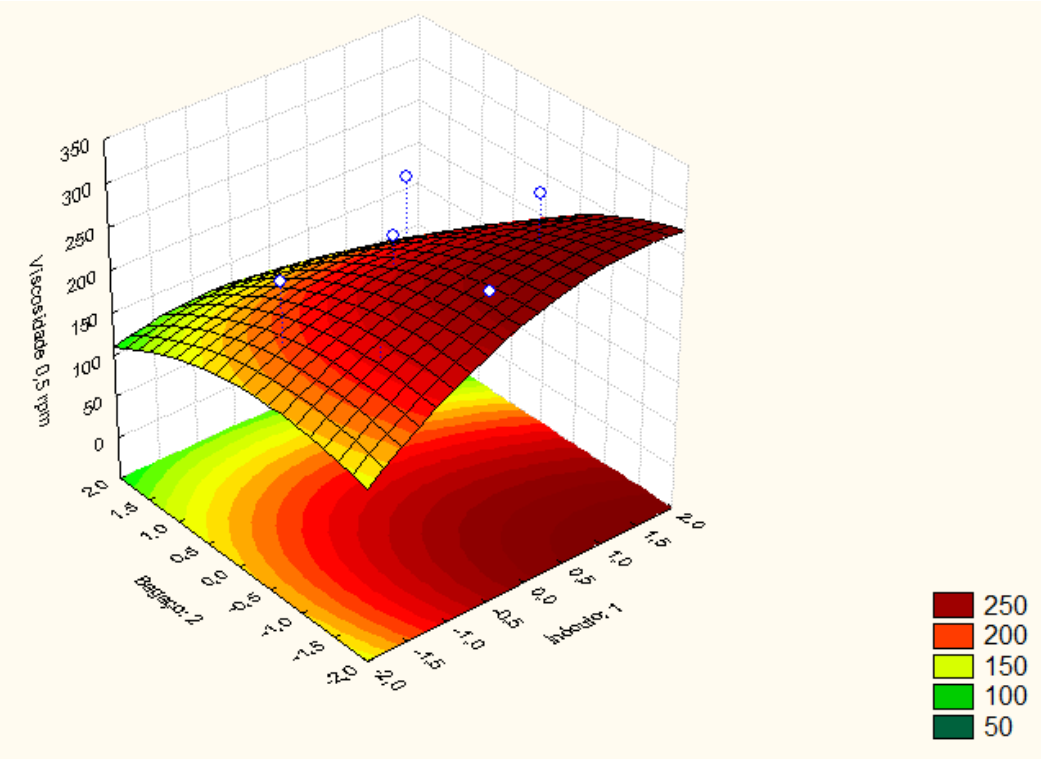


Figura 22. Superfície de resposta da variável viscosidade com rotação de 0,5 rpm da solução de goma xantana em relação à concentração do bagaço de cana-de-açúcar e de volume de inóculo.

Com os dados obtidos, pôde-se obter a equação do modelo estudado (Equação 3.3b).

$$Viscosidade = 224{,}95 + 8{,}1324x_1 - 10{,}5x_1^2 - 33{,}9819x_2 - 9{,}0x_2^2 - 11{,}7x_1x_2$$

(3.3b)

sendo,

x_1: concentração de inóculo;

x_2: concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

A produtividade obtida através das variáveis experimentais viscosidade e rendimento, também foi analisada utilizando a superfície de resposta, tabela de Análise de Variância, Diagrama de Pareto e Equação do Modelo. Os valores estão na Tabela 11, apresentada anteriormente.

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 23), nenhum dos parâmetros foram estatisticamente significativos nestas condições dentro dos resultados de confiança ($p<0,05$). Estes parâmetros causam pouca influência no processo, porém podem possuir maior influência sob outras condições, aumentando as concentrações de inóculo e diminuindo as de bagaço de cana-de-açúcar.

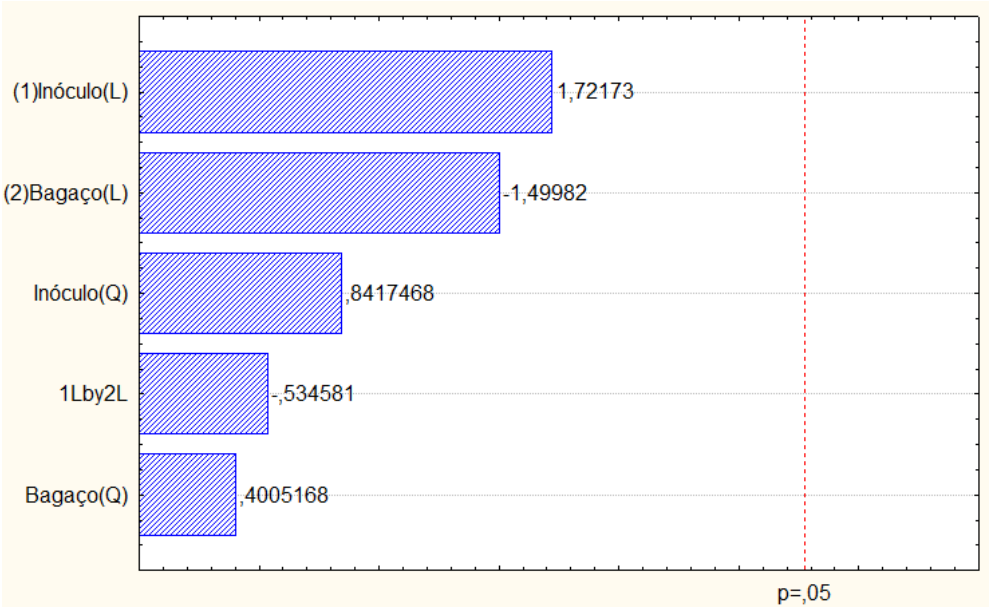


Figura 23. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável produtividade da solução de goma xantana pela cepa 13951.

Tabela 11. Valores da ANOVA para a variável produtividade da goma xantana pela cepa 13951

Parâmetro	GL	SQ	QM	F calc	P-value
Inóculo (L)	1	29280,8	29280,8	2,964353	0,160225
Inóculo (Q)	1	6998,7	6998,7	0,708538	0,447312
Bagaço (L)	1	22219,5	22219,5	2,249471	0,208043
Bagaço (Q)	1	1584,5	1584,5	0,160414	0,709246
Inóculo x Bagaço	1	2822,8	2822,8	0,285776	0,621272
Resíduo	4	39510,6	9877,64		
Total	9	100851,5			

Ftab(1;8;0,05) = 5,318 e Fcalc= 20,42

Da mesma forma como foi analisado o F calculado para a viscosidade e o rendimento, foi também calculado para a variável produtividade. Foi obtido valor superior do F calculado para o F tabelado, o que corresponde significância dos resultados obtidos dentro do limite de confiabilidade de 95%.

A Figura 24 apresenta os dados obtidos para a variável produtividade através do método da superfície de resposta.

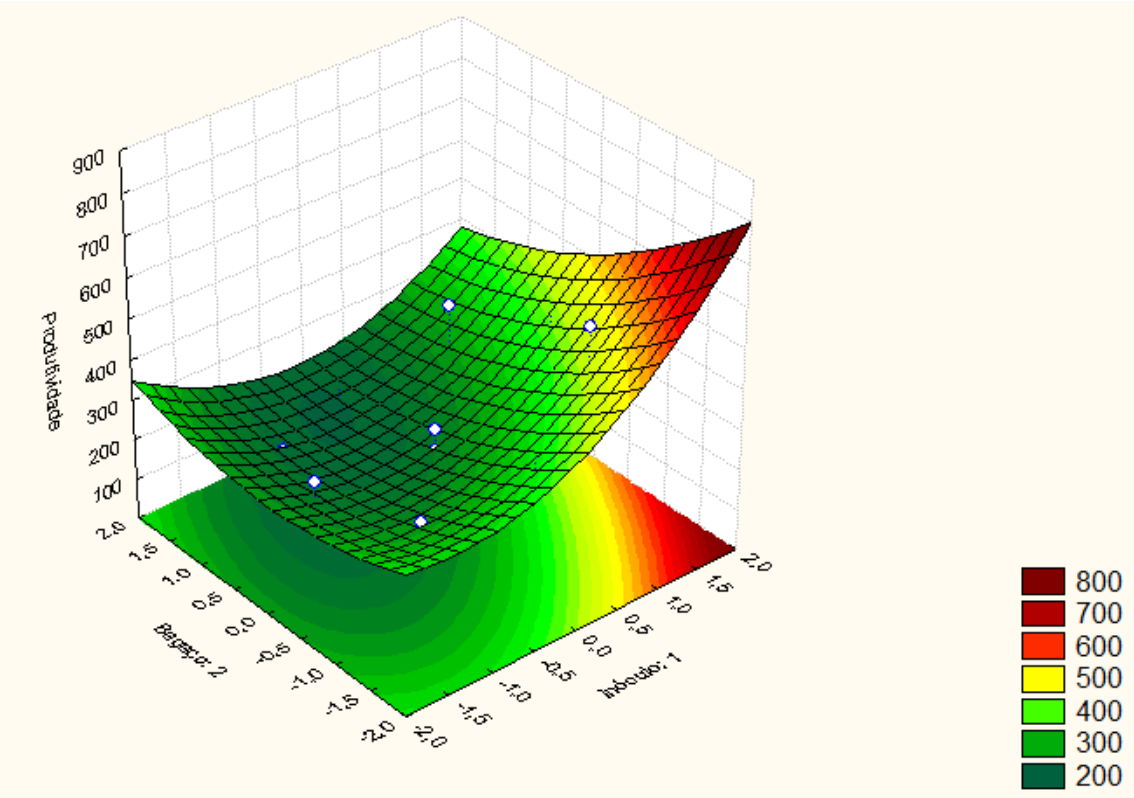


Figura 24. Superfície de resposta da variável produtividade da goma xantana em relação à concentração do bagaço de cana-de-açúcar e de volume de inóculo.

Observa-se que os pontos centrais apresentam valores baixos para a variável produtividade, que apresenta a relação entre as variáveis, rendimento e produtividade. Desta forma, os resultados encontrados para esta variável não corresponderam à otimização do substrato alternativo bagaço de cana-de-açúcar. O melhor resultado encontrado para esta variável são os níveis codificados +1 para o inóculo e -1 para o substrato alternativo. Deste modo, acredita-se que pode-se trabalhar com níveis mais altos de inóculo e mais baixos de bagaço de cana-de-açúcar, esperando desta forma, encontrar valores mais altos para a produtividade.

Com os dados obtidos, pôde-se obter a equação do modelo estudado (Equação 3.3c).

$$Produtividade = 238{,}66 + 60{,}50x_1 + 39{,}13x_1^2 - 52{,}70x_2 + 18{,}62x_2^2 - 26{,}57x_1x_2$$

(3.3c)

sendo,

x_1: concentração de inóculo;

x_2: concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

Segundo Gomes *et. al* (2015), os valores da produção média do biopolímero obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar variando a aeração e agitação foi de 2,38 $g.L^{-1}$, sendo sua maior produção de 7,62 $g.L^{-1}$. No presente trabalho, os parâmetros agitação e aeração não foram alterados e o maior rendimento foi de 0,96 $g.L^{-1}$ de goma xantana a partir do mesmo substrato, bagaço de cana-de-açúcar. Isto mostra que, mesmo com metodologia e variáveis diferentes, estas exercem grandes influências nas soluções e há produção do biopolímero desejado.

De acordo com Faria (2005), o maior valor encontrado para a produção de xantana utilizando caldo de cana pela bactéria *X. campestris pv. campestris* NRRL B-1459 foi de 0,632 $g.g^{-1}$ e 0,610 $g.g^{-1}$, para os dois planejamentos realizados, utilizando 4 litros de meio de produção. A metodologia empregada pelo autor foi diferente da proposta deste trabalho; as variáveis analisadas foram sacarose, concentração de extrato de levedura e concentração de nitrato de amônio.

5.3.3 Biomassa de malte

Ensaios preliminares foram realizados com o objetivo de utilizar a biomassa de malte como meio alternativo para a produção de goma xantana. O microrganismo utilizado foi o mesmo dos experimentos anteriores, a cepa 13951.

Para os ensaios descritos na Tabela 12 foram variados as concentrações de biomassa de malte e do volume de inóculo, consistindo para a primeira variável, ponto mínimo de 4,0 $g.L^{-1}$ e máximo de 8,0 $g.L^{-1}$. O ponto mínimo para o inóculo foi de 15,0 mL e máximo de 25,0 mL. Os volumes de água foram completados até chegar o volume final. Os pH foram corrigidos para pH 7.

Após o processo de fermentação, foi realizada a precipitação dos biopolímeros produzidos pelo meio alternativo utilizando álcool (3:1), os resultados dos rendimentos deste ensaio encontram na Tabela 12.

Tabela 12. Planejamento experimental utilizando biomassa de malte para a produção de bimassa de malte, resultados obtidos das variáveis rendimento ($g.L^{-1}$), viscosidade (cP) a 20 rpm e produtividade do experimento ($cP.L.g^{-1}$)

Ensaios	**Inóculo (% v/v)**	**Biomassa (% m/v)**	**Rendimento ($g.L^{-1}$)**	**Viscosidade (cP)**	**Produtividade ($cP.L.g^{-1}$)**
1	-1 (15,0)	-1 (4,0)	0,50	18,10	36,2
2	-1 (15,0)	+1 (8,0)	0,59	17,20	29,15
3	+1 (25,0)	-1 (4,0)	0,60	11,30	18,83
4	+1 (25,0)	+1 (8,0)	0,96	15,30	15,94
5	-1,41(13,0)	0 (6,0)	0,48	13,10	27,29
6	+1,41(27,0)	0 (6,0)	0,95	7,05	7,42
7	0 (20,0)	-1,41 (3,2)	0,77	24,50	31,82
8	0 (20,0)	+1,41 (8,8)	0,69	18,60	26,96
9	0 (20,0)	0 (6,0)	0,74	18,60	21,14
10	0 (20,0)	0 (6,0)	0,85	10,50	12,35

Os resultados foram obtidos por gravimetria logo após a precipitação e a secagem dos biopolímeros. Pela Tabela 12 foi possível calcular a média dos rendimentos que foi de 0,71 $g.L^{-1}$, os ensaios que apresentaram maiores rendimentos foram 4, 6 e 10. Isto pode ter ocorrido pelo fato das condições experimentais nestes meios ter sido mais favoráveis para a bactéria durante a fermentação. O microrganismo pode ter preferências nutricionais por maior concentração do substrato alternativo.

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 25), apenas a variável inóculo é estatisticamente significativa nestas condições dentro dos resultados de confiança ($p<0,05$). Este parâmetro influencia o processo de forma positiva, ou seja, é requerida maior concentração deste para melhores resultados. A Tabela 13 obtém o valor de F calculado.

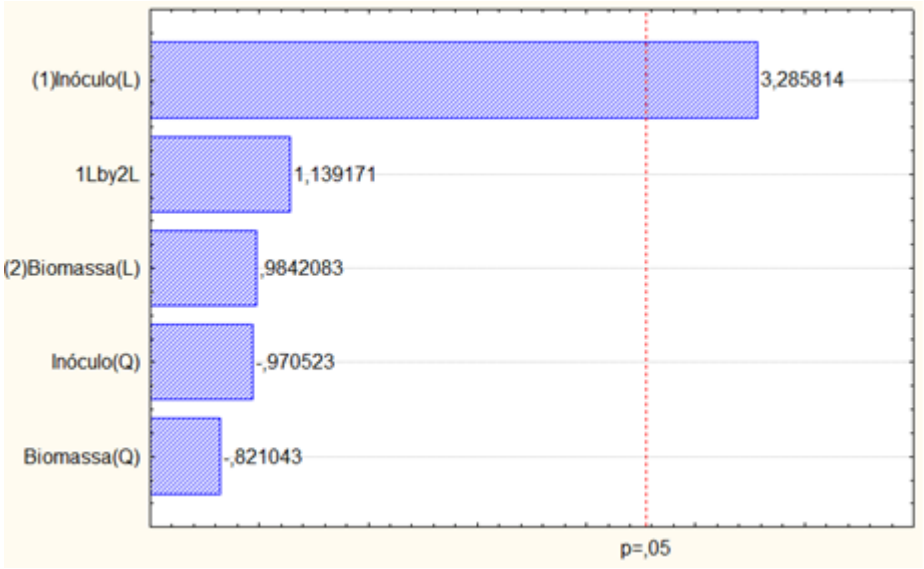


Figura 25. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável rendimento da produção de goma xantana pela cepa 13951.

Tabela 13. Valores da ANOVA para o rendimento da goma xantana a partir de biomassa de malte

Parâmetro	GL	SQ	QM	F calc	P-value
Inóculo (L)	1	0,159591	0,159591	10,79658	0,030335
Inóculo (Q)	1	0,013923	0,013923	0,94191	0,386743
Biomassa (L)	1	0,014318	0,014318	0,96867	0,38734
Biomassa (Q)	1	0,009964	0,009964	0,67411	0,457736
Inóculo x Biomassa	1	0,019182	0,019182	1,29771	0,318222
Resíduo	4	0,059126	0,014782		
Total	9	0,269112			

Ftab(1;8;0,05) = 5,318 e Fcalc= 36,41

A partir dos dados obtidos pela ANOVA foi possível fazer o cálculo do teste F, a fim de garantir que os dados obtidos estão dentro da estatística com nível de confiança de 95%. O valor de F é superior ao F tabelado, logo possui significância nos resultados obtidos da fermentação. Estes resultados serão utilizados para as análises da variável rendimento. A Figura 26 apresenta a superfície de resposta com os dados obtidos.

A Figura 26 apresenta a superfície de resposta do experimento através do modelo empírico. Observa-se que os pontos centrais se encontram em valores intermediários e os pontos com maiores rendimentos são os ensaios 4 e 6. Desta forma, observa-se que o inóculo é o fator mais significante do processo e deve ser utilizado em maiores concentrações com níveis codificados (+1,0 e +α), enquanto que a concentração de biomassa deve ser mais baixa, com níveis (-1,0 e –α).

Com os dados obtidos, pôde-se obter a equação do modelo estudado (Equação 3.4a).

$$Rendimento = 0{,}77 + 0{,}14x_1 - 0{,}051x_1^2 + 0{,}042x_2 - 0{,}047x_2^2 + 0{,}069x_1x_2$$

(3.4a)

sendo,

x_1: concentração de inóculo;

x_2: concentração de biomassa de malte.

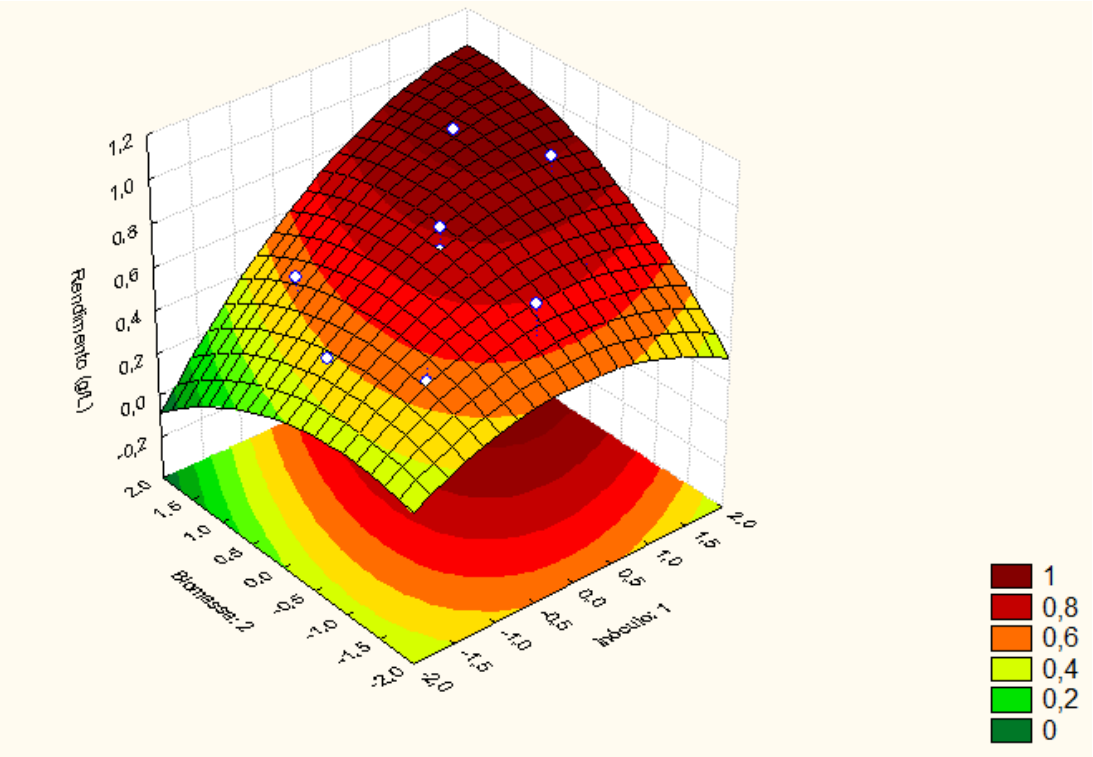


Figura 26. Superfície de resposta da variável rendimento da goma xantana em relação à concentração de biomassa de malte e de volume de inóculo.

Após a análise de rendimento, foi necessário a realização da variável viscosidade com rotação de 20,0 rpm. Os valores encontrados para a ANOVA estão na Tabela 14.

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 27), apenas a variável concentração de biomassa foi estatisticamente significativa nestas condições dentro dos

resultados de confiança (p<0,05). Os outros parâmetros podem possuir maior significância no processo sob menor concentração de inóculo e de biomassa.

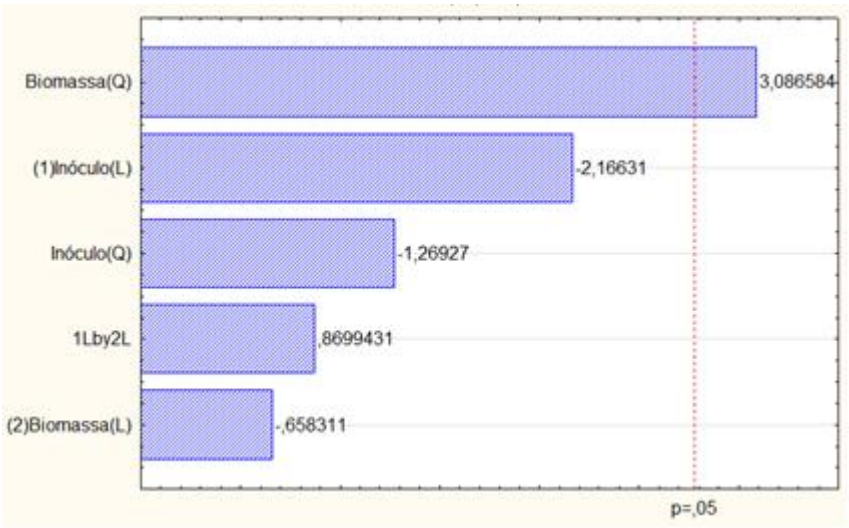


Figura 27. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável viscosidade da produção de goma xantana pela cepa 13951.

Tabela 14. Valores da ANOVA para a variável viscosidade da goma xantana pela cepa 13951

Parâmetro	GL	SQ	QM	F calc	P
Inóculo (L)	1	37,2212	37,2212	4,692879	0,096207
Inóculo (Q)	1	12,7779	12,7779	1,611050	0,273170
Biomassa (L)	1	3,4373	3,4373	0,433373	0,546301
Biomassa (Q)	1	75,5625	75,5625	9,526998	0,036696
Inóculo x Biomassa	1	6,0025	6,0025	0,756801	0,433422
Resíduo	4	31,7526	7,93141		
Total	9	219,2302			

Ftab(1;8;0,05) = 5,318 e Fcalc= 55,23

Pela Tabela de ANOVA (Tabela 14) foi possível fazer o cálculo do teste F, os dados obtidos são significativos dentro do nível de confiança de 95%. Isto pode ser

facilmente visualizado na Figura 28 através das superfícies de resposta, onde os pontos centrais representam baixos valores para a viscosidade.

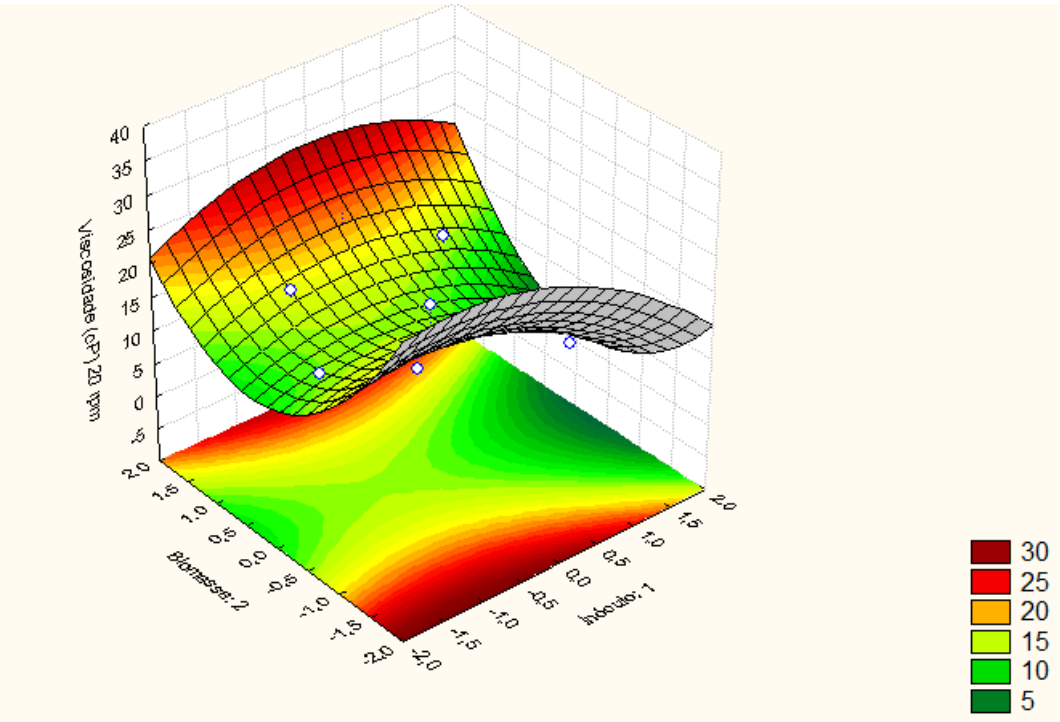


Figura 28. Superfície de resposta da variável viscosidade da goma xantana em relação à concentração de biomassa de malte e de volume de inóculo.

Pela Figura 28 nota-se que o inóculo deve ser trabalhado em menores concentrações (níveis codificados entre 0; -1,0 e –α) e a biomassa de malte pode ser trabalhada tanto em níveis mais baixos (-1,0) tanto altos (+α). Desta forma, espera-se encontrar viscosidades maiores para a biomassa de malte.

Com isso, pode-se obter a equação do modelo estudado (Equação 3.4b).

$$Viscosidade = 13{,}25 - 2{,}16x_1 - 1{,}67x_1^2 - 0{,}66x_2 + 4{,}07x_2^2 + 1{,}23x_1x_2 \quad (3.4b)$$

Sendo,

x_1: concentração de inóculo;

x_2: concentração de biomassa de malte.

A variável proposta produtividade obtida através das variáveis experimentais viscosidade e rendimento foi também analisada utilizando a Superfície de resposta, tabela de Análise de Variância, Diagrama de Pareto e Equação do Modelo. Os valores encontrados estão na Tabela 12, apresentada anteriormente.

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 29), as variáveis inóculo e biomassa de malte são estatisticamente significativas nestas condições dentro dos resultados de confiança ($p<0,05$), as demais variáveis causam pouca influência no processo. O inóculo pode ser trabalhado em menores concentrações enquanto a biomassa deve ser trabalhada em maiores. A Tabela 15 apresenta os valores do F calculado.

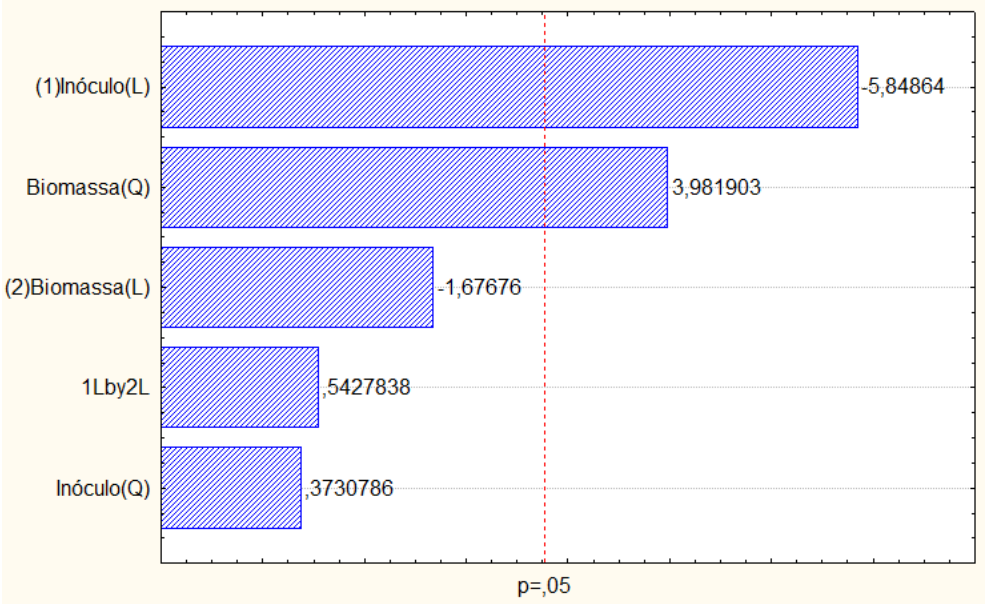


Figura 29. Diagrama de Pareto com o comportamento da variável produtividade da solução de goma xantana pela cepa 13951.

A partir dos dados obtidos pela Tabela 15 foi possível fazer o cálculo para o F calculado. Foi encontrado na tabela de F o valor de 4,737 para o F tabelado e obteve-se o valor de 51,93 para o F calculado. Deste modo, o F calculado é superior ao F tabelado, o que garante a significância dos dados dentro do nível de confiança de 95%. A Figura 30 retrata a superfície de resposta para a variável produtividade.

Tabela 15. Valores da ANOVA para a variável produtividade da goma xantana pela cepa 13951

Parâmetro	GL	SQ	QM	F calc	P-value
Inóculo (L)	1	425,7882	425,7882	34,20658	0,004263
Inóculo (Q)	1	1,7325	1,7325	0,13919	0,728019
Biomassa (L)	1	34,9965	34,9965	2,81152	0,168896
Biomassa (Q)	1	197,3628	197,3628	15,85555	0,016375
Inóculo x Biomassa	1	3,6672	3,6672	0,29461	0,616107
Resíduo	4	49,7902	12,4475		
Total	9	738,7177			

Ftab(2;7;0,05) = 4,737 e Fcalc= 51,93

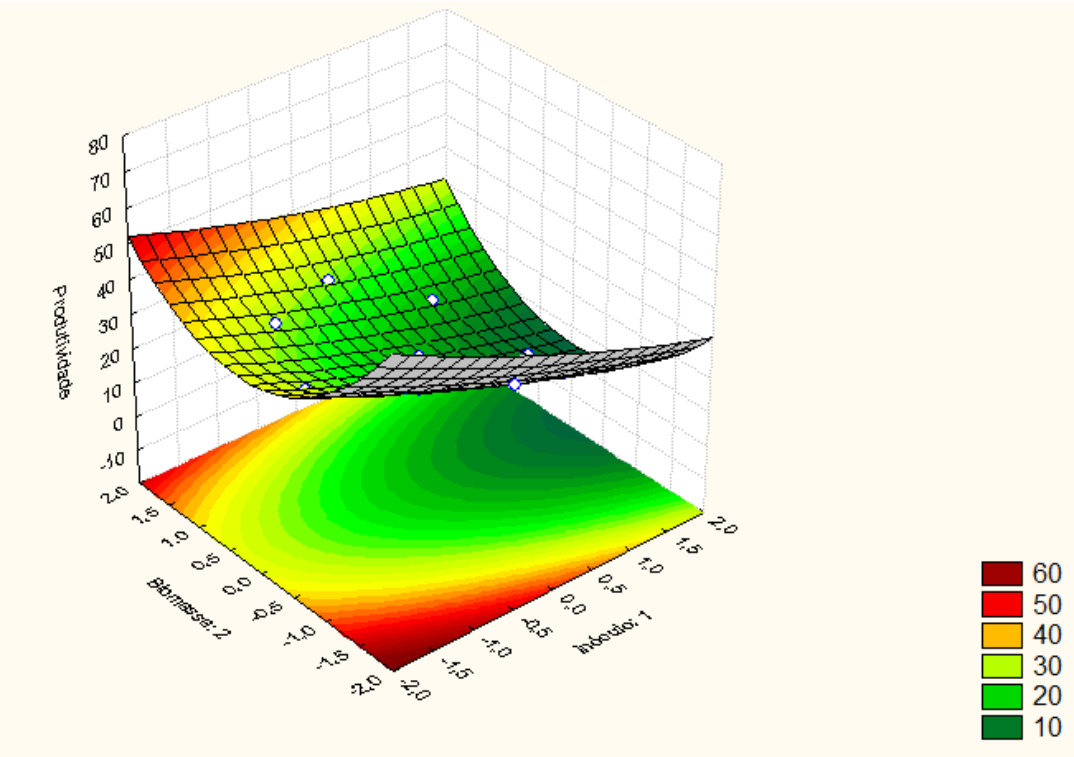


Figura 30. Superfície de resposta da variável produtividade da goma xantana em relação à concentração de biomassa de malte e de volume de inóculo.

A Figura 30 apresenta a superfície de resposta do experimento através do modelo empírico. Observa-se que os pontos centrais apresentam valores baixos para a

variável produtividade, que apresenta a relação entre as variáveis rendimento e produtividade. Desta forma, os resultados encontrados para esta variável não corresponderam à otimização do substrato alternativo biomassa de malte.

O ideal é trabalhar em menores concentrações de inóculo com níveis codificados entre (-1,0 e –α) e tanto menores com níveis codificados de (-1,0 e -α) quanto maiores, com níveis codificados (+1,0), para a variável biomassa.

Com os dados obtidos, pôde-se obter a equação do modelo estudado (Equação 3.4c).

$$Produtividade = 16{,}98 - 7{,}296x_1 + 0{,}62x_1^2 - 2{,}09x_2 + 6{,}57x_2^2 + 0{,}96x_1x_2$$

(3.4c)

sendo,

x_1: concentração de inóculo;

x_2: concentração de biomassa de malte.

De acordo com Menezes (2013), a produção do biopolímero utilizando resíduo de malte proveniente de cervejaria apresentou rendimento de 11,0 $g.L^{-1}$ com 60 $g.L^{-1}$ de meio alternativo a 250 rpm. No presente trabalho, a maior produção foi de 0,96 $g.L^{-1}$ utilizando 8 %(m/v) de substrato alternativo. Isto indica que pode-se utilizar a biomassa de malte como substrato alternativo para a produção de goma xantana.

5.3.4 Sacarose

A sacarose, meio padrão para a produção de goma xantana, foi preparada em duplicata na proporção de 2,0% (m/v) e o valor utilizado para o inóculo foram os pontos centrais utilizados nos demais ensaios, 11,5 mL e 15,0 mL. Estes meios foram suplementados com as mesmas concentrações de fosfato de potássio dibásico, uréia e os pHs foram corrigidos para 7, como descrito no item 4.7.

Comparando os valores encontrados de produção das gomas xantanas obtidas a partir da sacarose com os valores obtidos para as xantanas a partir de leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte, constatam-se rendimentos superiores para a bioconversão a partir das fontes alternativas. Em contrapartida há resultados superiores para a variável produtividade utilizando a sacarose. A Tabela 16 apresenta os valores médios de rendimento, viscosidade e produtividade dos substratos padrão e os alternativos.

Tabela 16. Valores de rendimento, viscosidade e produtividade dos substratos padrão e alternativos

Substrato	Rendimento ($g.L^{-1}$)	Viscosidade (cP)	Rotação (rpm)	Produtividade ($cP.L.g^{-1}$)
Sacarose*	0,19	417,2	1,0	2195,79
Leite de mandioca	2,81	200,6	1,0	71,39
Bagaço de cana-de-açúcar	0,76	209,4	0,5	275,53
Biomassa de malte	0,71	15,4	20,0	21,69

*Sacarose = sacarose produzida no ponto central de 11,5 mL

As gomas xantanas produzidas com meio padrão de sacarose e 11,5 mL de inóculo apresentaram rendimento médio 0,19 $g.L^{-1}$. Na concentração de 0,5% (m/v) de solução de goma xantana na menor rotação do equipamento as gomas apresentaram torque superior ao limite de confiança do equipamento (maior que 90%).

Pela Tabela 16 nota-se que os rendimentos médios de produção de goma xantana mostram que os meios alternativos apresentam maiores valores que o meio padrão. Porém, a viscosidade média encontrada para a sacarose é maior que os demais meios e consequentemente, a sua produtividade é maior. Isto demonstra a alta viscosidade da goma xantana produzida com sacarose e por isto, é o substrato mais utilizado nas diversas indústrias.

Apesar da sacarose possuir valores superiores de viscosidade e produtividade, percebe-se que os meios alternativos, leite de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar também podem ser utilizados para a utilização em diversas indústrias em relação as suas necessidades como ocorre com o meio padrão, pois apresentam rendimentos e viscosidades satisfatórios. O meio alternativo, biomassa de malte, não apresentou resultados satisfatórios para a viscosidade e produtividade e desta forma, seria necessário estudá-la de forma a otimizar e encontrar valores mais relevantes para a indústria.

Segundo Brandão *et al* (2008), a produção de goma xantana utilizando sacarose como fonte de carbono padrão variou de 3,17 $g.L^{-1}$ a 4,02 $g.L^{-1}$, com rendimento médio

de 3,55 $g.L^{-1}$. O substrato alternativo utilizado foi caldo de cana e apresentou rendimento que variou de 14,23 $g.L^{-1}$ a 33,54 $g.L^{-1}$, com um rendimento médio de 21,9 $g.L^{-1}$. Foram utilizados três cepas diferentes da bactéria que foram *X. campestris manihotis* 1182, *X. campestris campestris* 1866 e *X. campestris pv campestris* 2149.

Segundo Menezes *et al.* (2012), a produção do biopolímero utilizando sacarose como fonte de carbono variou de 0,64 $g.L^{-1}$ a 9,67 $g.L^{-1}$, com uma média de 4,86 $g.L^{-1}$. Os substratos fermentativos obtidos de resíduos agroindustriais variaram de 0,15 $g.L^{-1}$ a 45 $g.L^{-1}$ sendo produzidos por glicerina do biodiesel e resíduo do suco de maçã, respectivamente, com uma média de produção de 12,8 $g.L^{-1}$. Neste artigo, houve ainda resultados favoráveis para produção de goma xantana utilizando como substrato o soro de leite, os rendimentos variaram em 12,01 $g.L^{-1}$ a 36 $g.L^{-1}$. Tanto o soro de leite quanto o resíduo de suco de maçã utilizados para a produção da goma xantana obtiveram rendimentos superiores ao registrado com o meio padrão de sacarose.

De acordo com Nery *et al.* (2008), os valores da produção de goma xantana obtidas a partir de substrato alternativo soro de leite foram 21,90 $g.L^{-1}$ e 12,36 $g.L^{-1}$, respectivamente, enquanto a produção da xantana a partir de sacarose foi de 6,62 $g.L^{-1}$, sendo que o meio alternativo teve produção três vezes maior que a produção com meio padrão. Isto também foi obtido no presente trabalho, onde o rendimento de goma xantana a partir do meio padrão foi baixo, porém a viscosidade desta foi superior a dos substratos alternativos.

Apesar dos diferentes substratos e das mesmas condições impostas nos experimentos citados da literatura e neste trabalho, percebe-se que há grande diferença de rendimento. Isto pode ser causado pela diferente linhagem utilizada para a produção da xantana bem como dos substratos e das condições do processo, como concentração de substrato alternativo, volume de inóculo, suplementação de meio, entre outros.

5. 4 Resultados da modelagem utilizando a Transformada Z

Com os balanços de massa realizados e pelas equações do Espaço de Estado discreta de *Cx*, *Cs* e *Cp* para as simulações do bioprocesso em estudo (modo batelada e modo contínuo), seguem os resultados obtidos utilizando a Transformada Z. Vale ressaltar que este tipo de análise só é válido até 4 horas de cultivo, pois é correspondente a fase exponencial e condiz até onde a Transformada Z é aplicável. A Figura 31 ilustra o resultado da modelagem utilizando um sistema em modo batelada. A

metodologia da Transformada Z é discreta e pontual, por isso a figura não apresenta característica contínua. Esta representa o crescimento das células, o consumo do substrato e a formação do biopolímero, que neste caso não houve, devido ao curto tempo de atuação no sistema. Normalmente, percebe-se um indício do início da produção de goma xantana a partir do tempo de 6 a 12 horas de cultivo.

A Figura 31 demonstra que, a cada hora um pacote de células gera outro pacote e assim sucessivamente. A alimentação das células com o substrato ocorre de hora em hora, de forma pontual até cessar, devido à condição batelada, onde a vazão de entrada é nula. Por isto o sistema é dito discreto e não contínuo.

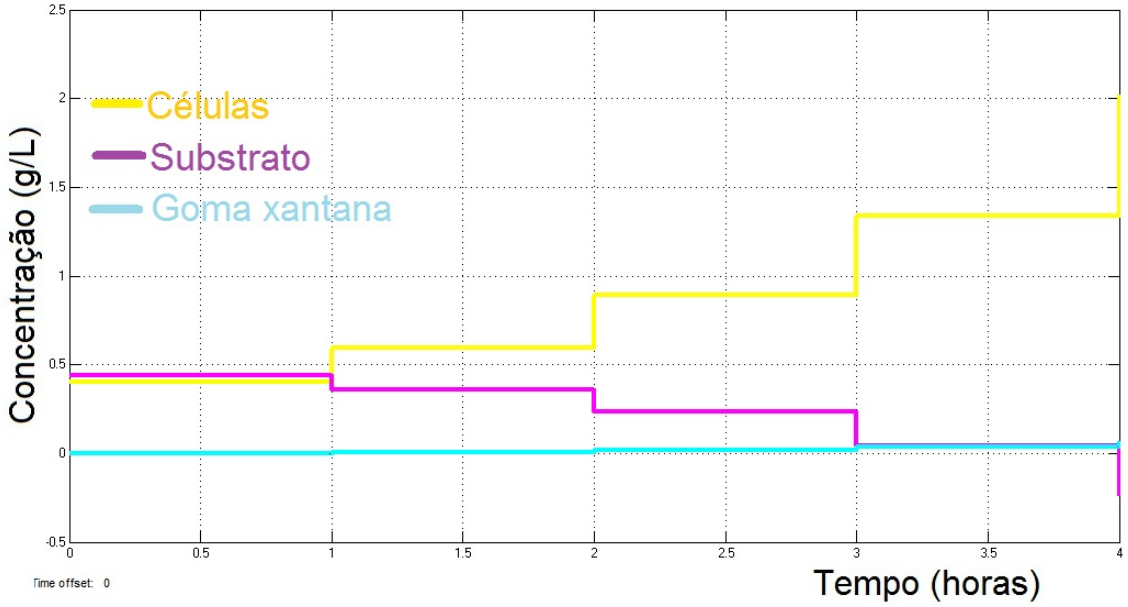


Figura 31. Modelagem do sistema discreto em regime batelada via equação plano de estado.

A modelagem utilizando Transformada Z para biorreator contínuo apresenta a mesma característica pontual em tempo discreto para biorreator em modo batelada. A Figura 32 ilustra o resultado da modelagem utilizando um sistema em modo contínuo. A Figura que representa a simulação em biorreator contínuo demonstra que, a cada hora um pacote de células gera outro pacote e assim sucessivamente. Este valor tende a aumentar com a introdução de mais substrato no meio. A alimentação das células pelo substrato ocorre de hora em hora, de forma pontual. Este valor tende a diminuir devido ao grande número de células que necessitarão de mais nutriente a cada ponto. Desta forma, a concentração de substrato chegará ao seu valor mínimo de 0,1 $g.L^{-1}$.

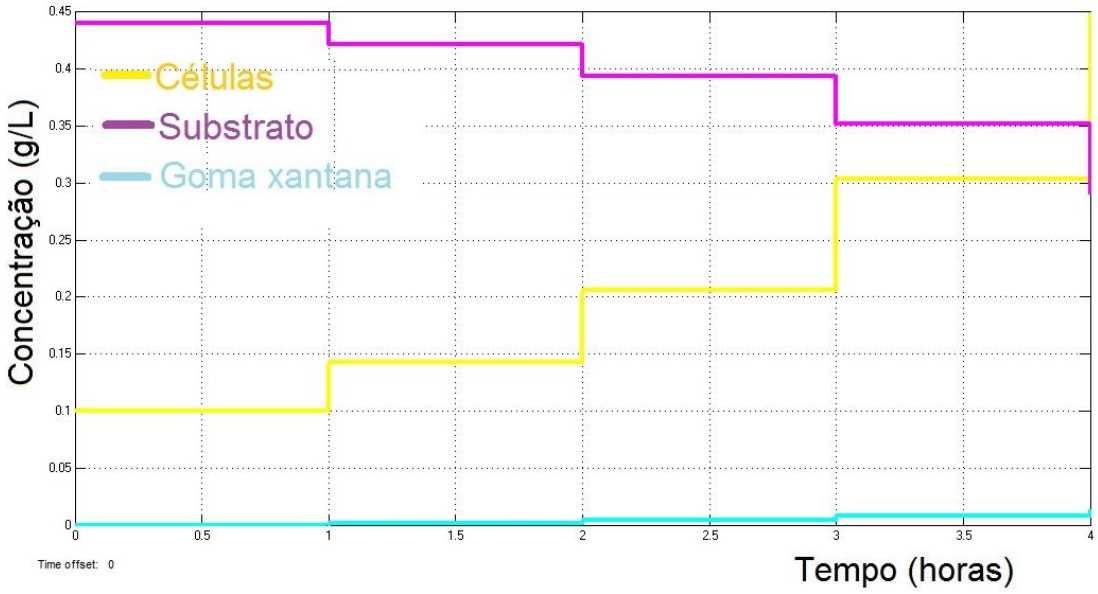


Figura 32. Modelagem do sistema discreto via equação plano de estado em regime contínuo.

Pela simulação, houve uma pequena formação de goma xantana a partir das 2 horas de cultivo. Porém, não é possível obter essa produção em um curto período de tempo em condições experimentais, pois a bactéria precisa, primeiramente, se adaptar as condições fornecidas pelo meio e a partir daí se multiplicar para produzir o polissacarídeo de interesse.

Apesar da Transformada Z não ser utilizada em processos fermentativos, esta pode ser aplicada, pelo fato de se trabalhar em tempo discreto e pontual. Quando há retirada de amostras em um bioprocesso, geralmente, retira-se em determinados tempos estabelecidos, ou seja, de forma pontual, o que representará o sistema como um todo através da amostragem.

5.5 Resultados da modelagem utilizando Modelos cinéticos

Os modelos estudados foram modelados para biorreatores em batelada e biorreatores contínuos com volume útil de 4,5 L, através dos dados obtidos da cinética com Erlenmeyers de 250 mL. Estes modelos foram aptos para ajustar os dados experimentais. A cinética foi realizada por 24 horas. A Tabela 17 apresenta os dados da concentração de biomassa (*Cx*), substrato (*Cs*) e produto (*Cp*). A Figura 33 apresenta as cinéticas obtidas com o experimento.

Tabela 17. Dados obtidos da cinética das concentrações de biomassa (*Cx*), substrato (*Cs*) e produto (*Cp*) ao longo do tempo do experimento

Tempo (h)	Cx	Cs	Cp
0	0,4	0,440	0,0
2	1,0	-*	0,0
4	1,7	-*	0,0
6	1,8	0,022	0,1
9	1,8	0,000	0,3
18	1,7	0,000	0,6
24	1,5	0,000	0,7

*os dados não foram obtidos

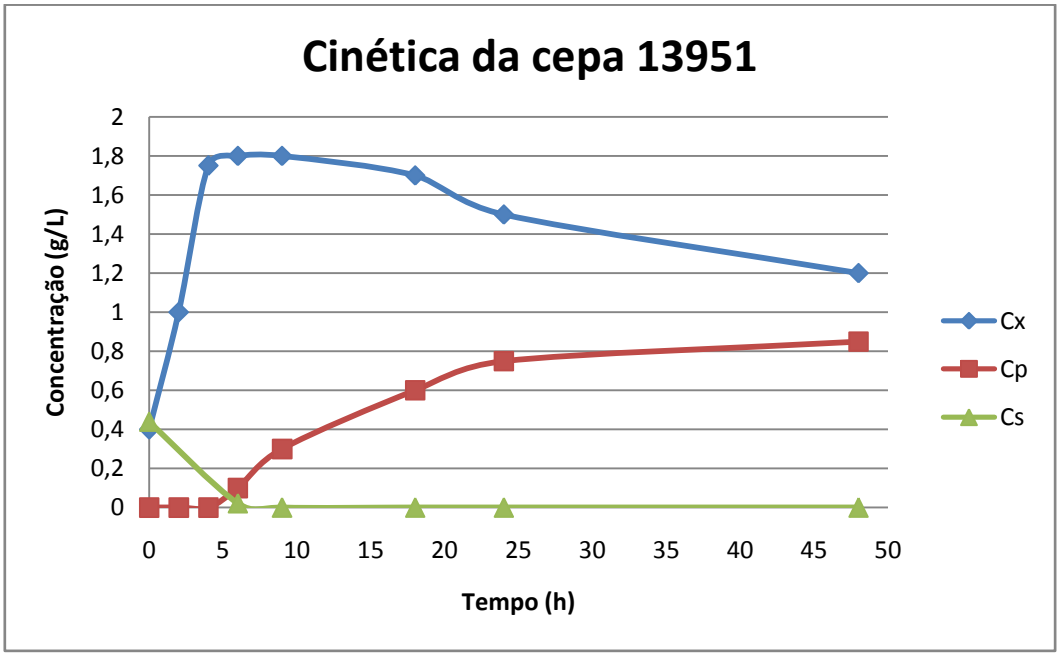


Figura 33. Cinética das concentrações de biomassa (*Cx*), substrato (*Cs*) e produto (*Cp*) ao longo do tempo obtido pelo experimento.

A determinação dos parâmetros ($\mu_{máx}$, $X_{máx}$, m, λ, α e β) das equações 1.7, 2.6 e 2.7, para os ajustes nos modelos cinéticos e para a Transformada Z foram calculados através dos dados obtidos pela cinética realizada para a produção do biopolímero, obtendo as concentrações de biomassa (*Cx*), produto (*Cp*) e substrato (*Cs*). Apenas os parâmetros λ e β tiveram de ser ajustados empiricamente de acordo com cada modelo estudado, os demais parâmetros foram os mesmos para ambos os modelos. A Tabela 18

apresenta os valores dos parâmetros encontrados neste trabalho e no de Portela *et. al* (2008), que apresenta condições de processo semelhantes à utilizada.

Tabela 18. Parâmetros obtidos e ajustados dos modelos cinéticos propostos

Parâmetros	Valores encontrados neste trabalho pelos modelos cinéticos	Valores encontrados no trabalho de Portela *et. al* (2008)*
$\mu_{máx}$ (h^{-1})	0,490	0,428
$X_{máx}$ (g_{cel}/L)	1,800	2,624
α ($g_{sac.}/g_{cel}$)	0,300	2,409
β ($g_{sac}.(g_{cel}.h)^{-1}$)	0,068[1] – 0,0068[2]	0,392
m ($g_{xant.}/g_{cel}$)	0,071	1,279
λ($g_{xant}.(g_{cel}.h)^{-1}$)	0,015[1] – 0,150[2]	0,198
Yx/s (g_{cel}/g_{sac})	3,350	0,769
Yx/p (g_{cel}/g_{xant})	14,000	0,415
Yp/s (g_{xant}/g_{sac})	0,239	0,530

* Valores encontrados para 25 $g.L^{-1}$ de concentração de sacarose

[1] Modelo de Monod; [2] Modelo de Verhulst

Os fatores de conversão de substrato em células (Yx/s) e de produto em relações às células (Yx/p) foram superiores aos esperados. Este fator é característico das razões estequiométricas da equação de substrato (sacarose), células de microrganismo (bactéria) e de produto (goma xantana).

$$C_{12}H_{22}O_{11} + aO_2 + bH_gO_nN_i \rightarrow cCH_jO_kN_l + dCO_2 + eH_2O + f(C_mH_nO_oN_p)_n$$

Sendo, $C_{12}H_{22}O_{11}$é a sacarose;

$CH_jO_kN_l$ são as células de biomassa;

e, $(C_mH_nO_oN_p)_n$ é o produto extracelular (goma xantana), que no caso tem fórmula molecular de $(C_{35}H_{49}O_{29})_n$.

Para este trabalho não foi possível obter os parâmetros *j*, *k* e *l* da equação das células da bactéria.

Os coeficientes estequiométricos *a*, *b*, *c*, *d*, *e* e *f* podem ser obtidos obtendo-se os dados de oxigênio dissolvido e de gás carbônico presentes durante o processo fermentativo. Supõe-se que 1 mol de sacarose produza *f* moles de goma xantana. Como

não possuímos os dados estequiométricos, não será possível obter esses coeficientes e desta forma, supõe-se apenas a razão de células e substrato.

De acordo com Steinbüchel (2004) a massa molar de goma xantana varia de 4 a $12x10^6$ g.mol^{-1} e com Doran (1995), $5x10^6$ g.mol^{-1}.

O número de ramificações médio encontrado é a razão da massa molar média, $8x10^6$ g.mol^{-1}, com n ramificações, $(C_{35}H_{49}O_{29})_n$, pela massa molar de $C_{35}H_{49}O_{29}$, que é 933,0 g.mol^{-1}. Desta forma, o valor encontrado médio é de 8574 ramificações. A goma xantana é um polissacarídeo altamente ramificado.

Pela equação estequiométrica da produção de goma xantana e considerando 1 g de sacarose com massa molar de $342{,}3\ g.mol^{-1}$, tem-se que, há grande quantidade de polissacarídeo produzido, como pode ser visualizado abaixo:

$$\frac{8{,}0x10^6 g.mol^{-1}}{342{,}3\ g.mol^{-1}} = 23.371{,}3\ \frac{moles\ de\ goma\ xantana}{moles\ de\ sacarose}$$

Percebe-se que com pouca quantidade de substrato obtém-se grande quantidade de biopolímero formado através da fermentação. Logo, os fatores de conversão obtidos são maiores.

5.5.1 Modelagem de biorreator contínuo utilizando equação de Verhulst

A Figura 34 ilustra a modelagem do balanço de massa utilizando a equação de Verhulst (1.7) para a equação da biomassa (crescimento microbiano), equação do substrato e equação do produto para biorreator contínuo. Pode-se notar que a concentração de substrato aumenta com o acúmulo deste que não foi consumido pelo microrganismo. A produção de goma xantana aumenta com o passar do tempo devido às concentrações de biomassa e de substrato.

A curva de crescimento da bactéria mostra que a partir do tempo de 20 horas, o crescimento exponencial cessa e o sistema permanece em estado estacionário até o tempo de 50 horas. A modelagem não demonstrou a curva de declínio microbiano, pois como o sistema é contínuo, a concentração de substrato é sempre a mesma, não levando-se em consideração a fase de morte celular.

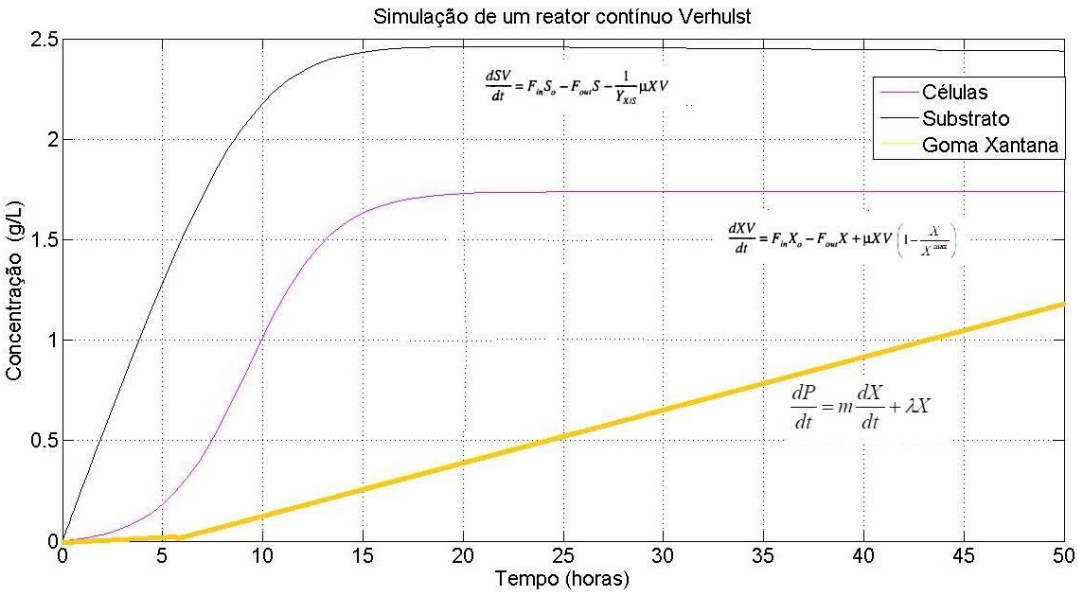


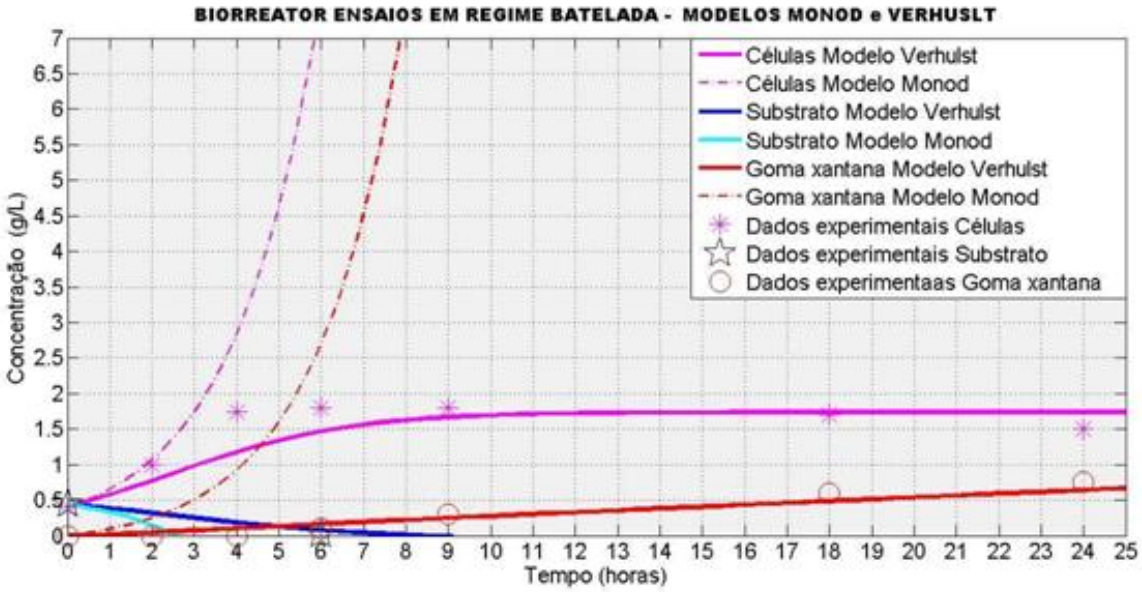
Figura 34. Simulação utilizando biorreator contínuo utilizando modelo cinético de Verhulst.

5.5.2 Modelagem dos modelos cinéticos em biorreator batelada

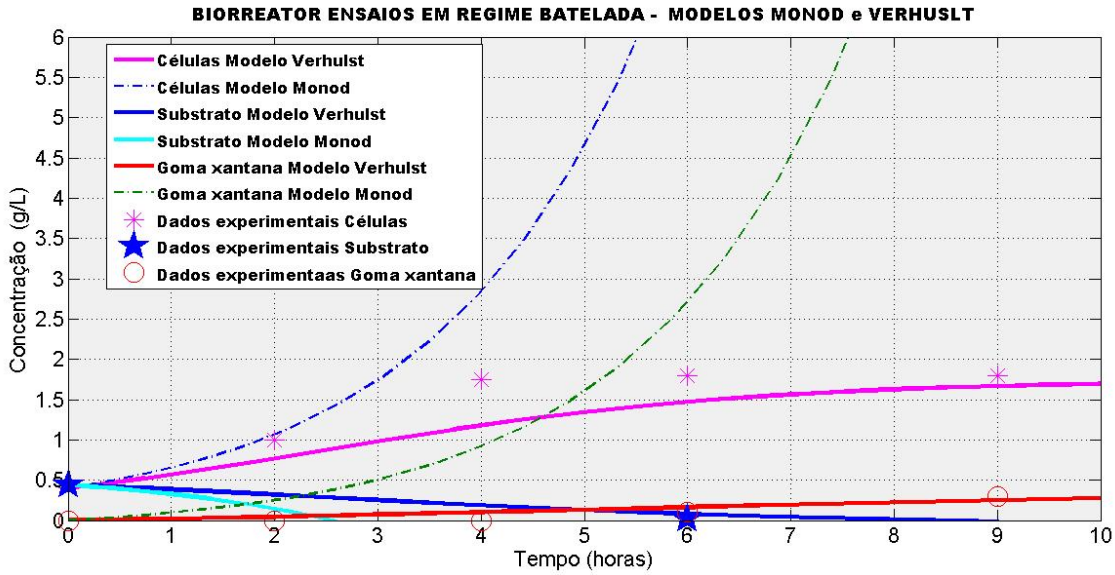
Os modelos cinéticos estudados conseguiram descrever o comportamento da produção de goma xantana utilizando os dados experimentais para as equações de Verhulst e de Monod, e desta forma, os resultados foram comparados.

Alguns parâmetros não puderam ser determinados e foram ajustados empiricamente, como λ e β. As simulações foram resolvidas utilizando a função ODE45 no MatLab®, que consiste na resolução de sistemas de equações diferenciais ordinárias não lineares pelo método de Runge-Kutta de quarta e quinta ordens.

A Figura 35 ilustra a modelagem de biorreator em batelada empregando os modelos de Monod e Verhulst, comparando com os dados experimentais obtidos com a cinética de produção do biopolímero em estudo.



(a)



(b)

Figura 35. Modelagem de biorreator em batelada empregando os modelos de Monod, Verhulst e dos dados experimentais obtidos com a cinética de produção do polissacarídeo, (a) com tempo de fermentação de 25 horas e (b) com tempo de 10 horas.

A Figura 35 retrata a modelagem do balanço de massa utilizando a equação de Monod e a de Verhulst (1.7) para a equação da biomassa (crescimento microbiano), equação do substrato e equação do produto para biorreator contínuo. Foram acrescentados os valores obtidos da cinética com os dados experimentais.

O modelo que mais se ajusta aos dados experimentais é o modelo de Verhulst, que retrata o sistema com restrições de esgotamento dos recursos com o aumento da

população. O modelo de Monod, por ser muito simples, considera apenas o crescimento populacional de forma exponencial e não considera nenhuma restrição de recursos, o que não representa a modelagem real. Estes valores tendem a crescer exponencialmente, como pode ser observado na Figura 35.

Ambos os modelos cinéticos mostram um decaimento rápido em relação ao substrato, sacarose. A concentração utilizada durante todo o processo da cinética foi muito baixa, 0,44 $g.L^{-1}$. Acredita-se que o baixo valor de concentração inicial de sacarose resultou em baixos rendimentos do polissacarídeo. Segundo Portela *et. al* (2008) em concentrações baixas de substrato inicial tem-se o favorecimento do crescimento celular em detrimento da formação de produto.

Portela *et. al* (2008) utilizou caldo de cana com concentração inicial de 15 $g.L^{-1}$ e houve produção superior a 15 $g.L^{-1}$ do biopolímero. Sabe-se que o caldo de cana apresenta maior concentração de sacarose em relação ao bagaço. Logo, o meio fermentativo que possui o resíduo poderia ser suplementado com maior fonte de carbono, como a sacarose.

A fim de se estudar o modelo cinético que mais se assemelha aos dados experimentais, foi realizada a modelagem em biorreator em batelada e biorreator contínuo, utilizando o modelo cinético de Verhulst. A Figura 36 ilustra o resultado da modelagem utilizando um sistema em modo contínuo e em modo batelada utilizando o modelo cinético de Verhulst.

Nota-se que a concentração do substrato em batelada tende a cair mais rapidamente que o contínuo, pelo fato de não haver entrada de substrato no processo. Porém, como a concentração de células aumenta, a concentração de substrato diminui até permanecer em seu valor mínimo de 0,1 $g.L^{-1}$. O crescimento microbiano em um biorreator contínuo tende a demorar mais pelo fato da alimentação do reator e consequentemente a diluição do meio fermentativo. O mesmo efeito pode ser observado na produção do biopolímero.

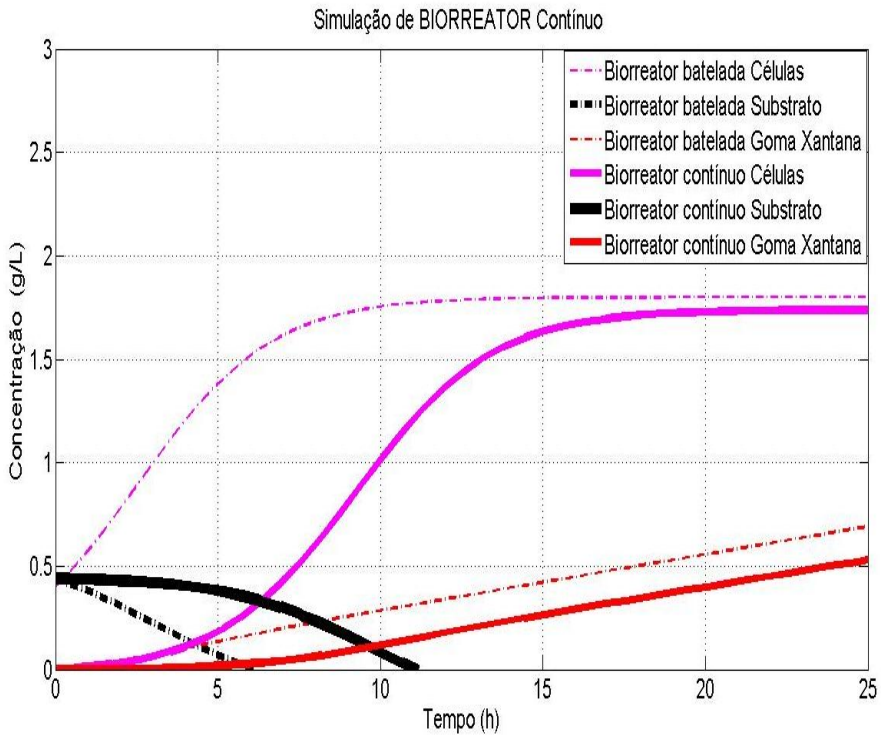


Figura 36. Modelagem do modelo cinético de Verhulst utilizando biorreator em batelada e biorreator contínuo.

5.6 Produção de goma xantana em biorreator Coluna de Bolhas

O aumento de escala fermentativa foi proposta para analisar a produção de goma xantana utilizando biorreator Coluna de Bolhas em batelada com volume útil de 4,5 L.

Como houve redução de cerca de 60% do volume de inóculo e da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar, foram utilizados os 200 mL disponíveis para o inóculo, o que correspondeu a 40,4% do volume necessário e 34,7 g de bagaço, que correspondeu à mesma proporção para esta variável.

A amostra não foi retirada no dia de inoculação, por não possuir biopolímero formado. A partir do primeiro e do segundo dia de fermentação, foram retiradas duas amostras por dia; do terceiro ao quinto dia, as amostras foram retiradas de 24 em 24 horas. Foi acrescentado cerca de 4 gotas de antiespumante por dia no biorretator, por apresentar espuma que poderia prejudicar na taxa de transferência de oxigênio dentro do reator.

As amostras retiradas no biorreator passaram pelos mesmos procedimentos de precipitação e preparação das amostras para análise de viscosidade como descrito em 4.7 e 4.8 da metodologia. A Tabela 19 apresenta os valores dos rendimentos obtidos na

produção e da reologia da goma xantana obtidas neste experimento utilizando biorreator Coluna de Bolhas.

Tabela 19. Valores dos rendimentos e da análise de reologia obtidos na produção de goma xantana utilizando bagaço de cana-de-açúcar em biorreator Coluna de Bolhas

Tempo (h)	Rendimento ($g.L^{-1}$)	Viscosidade a 1 rpm (cP)
24	0,285	40,2
42	0,361	93,0
48	0,403	92,4
72	0,438	111,6
96	0,295	150,0
116	0,114	169,2

A aeração foi ajustada em 5 vvm e a agitação foi controlada através desta, por se tratar de um biorreator Coluna de Bolhas, onde a aeração controla a agitação e a taxa de transferência de oxigênio. Porém, no quinto dia de fermentação, houve um problema de comunicação entre o biorreator e o programa e, este interrompeu o processo de aeração.

A temperatura e o pH estavam sendo controlados, porém devido ao problema de comunicação do programa de controle e do biorreator, estes parâmetros deixaram de ser controlados. O controle do oxigênio e do gás carbônico em porcentagem e em ppm (partes por milhão) também não foram controlados. Desta forma, a única variável que foi controlada durante todo o processo foi o tempo. Sem os valores dos parâmetros, não houve uma análise precisa e rigorosa quanto a este experimento. A Figura 37 apresenta o programa do biorreator controlado pelo computador.

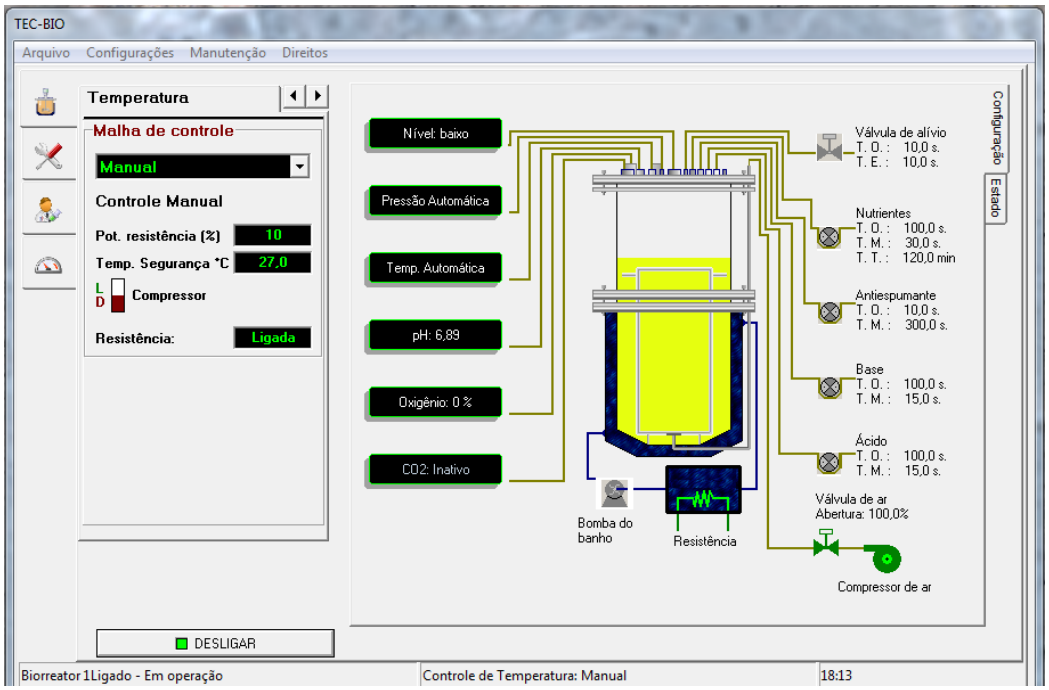


Figura 37. Layout do programa utilizado com os parâmetros a serem controlados.

As gomas xantanas foram preparadas na concentração de 0,05% (m/v), por haver baixo rendimento destas. Os biopolímeros produzidos no biorreator Coluna de Bolhas não apresentaram rendimento alto ou superior à menor escala (*shaker*), como era esperado. Acredita-se que por não haver controle preciso da temperatura, pH, concentração de oxigênio, o meio tenha sido prejudicado e por isso tenha apresentado baixos rendimentos e estes tenderam a diminuir com o passar do tempo. Como o processo de aeração foi interrompido no último dia e o meio estava mais viscoso, o processo de transferência de oxigênio tenha prejudicado o rendimento na última amostra.

As viscosidades obtidas foram condizentes, pois a bactéria produz mais biopolímero e excreta para o meio e este tende a aumentar com o passar do tempo. Esperava-se maior viscosidade pela produção em maior escala, porém como o processo foi interrompido, este parâmetro pode ter sido prejudicado também.

Outros autores também produziram goma xantana utilizando biorreatores. Segundo Brandão (2012), o substrato utilizado foi a glicerina bruta residual do biodiesel, 2% (m/v), e foi utilizado 20% (v/v) de inóculo em um biorreator com volume útil de 3,0 L. Foi realizado um planejamento experimental e obteve-se os melhores resultados no ponto central (1 vvm e 500 rpm) com rendimento de 6,4 $g.L^{-1}$ de goma xantana e 3,3 $g.L^{-1}$ de massa celular. O tempo de fermentação foi o usual, 120 horas.

De acordo com Faria (2005), a produção de goma xantana foi realizada em biorreator com 4,0 L de volume útil, utilizando caldo de cana como substrato e realizando um planejamento experimental DCCR. Os parâmetos agitação e aeração foram 750 rpm e 0,5 vvm, respectivamente. O tempo de fermentação foi 24 horas. Os valores encontrados foram os pontos centrais, com produção média de 17,25 $g.L^{-1}$ e 24400 cP a 0,75% (m/v) de solução de goma xantana a 25 s^{-1}.

Segundo Gomes *et. al* (2015), a produção de goma xantana foi realizada em um biorreator com 1,5 L de capacidade e utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Os resultados encontrados para o rendimento foi de 7,62 $g.L^{-1}$ e 123,80 cP a 25 s-1. A solução com biopolímero foi preparado a 0,5% (m/v). Os parâmetros aeração e agitação foram de 1,0 vvm e 750 rpm, respectivamente.

Os valores encontrados para os demais ensaios utilizando biorreator para a produção de goma xantana, apresentaram rendimentos e viscosidades superiores que o ensaio proposto. Isto pode ter acontecido pelo fato dos biorreatores utilizados serem do tipo CSTR (*Continuos Stirred-Tank Reactor*, Reator Contínuo de Tanque Agitado) onde são necessárias a agitação e a aeração, enquanto utilizamos o biorreator Coluna de Bolhas, onde a própria agitação é causada pela aeração. O fato dos processos de controle de temperatura e aeração ter sido interrompido podem ter prejudicado todo o processo de rendimento e viscosidade do biopolímero. Pode ser que o biorreator Coluna de Bolhas não seja o ideal para a produção de goma xantana, pois não há controle de agitação.

De acordo com Brandão (2012), a agitação e a aeração são parâmetros importantes e necessários que devem ser controlados, pois devem evitar condições de anaerobiose decorrentes da alta viscosidade do meio pela formação do polissacarídeo, visto que a bactéria é estritamente aeróbia. Constata-se que as produções de células e de goma xantana durante o processo fermentativo são influenciadas por aumentos nos níveis de agitação e aeração. Logo, uma combinação adequada é requerida e deve ser estudada para evitar a limitação na transferência de oxigênio ou condições de estresse hidrodinâmico.

6. CONCLUSÃO

Os substratos alternativos, leite de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte utilizados para a produção da goma xantana apresentaram rendimentos médios para os meios alternativos de 2,81 $g.L^{-1}$, 1,03 $g.L^{-1}$ e 0,71 $g.L^{-1}$, respectivamente. Enquanto a produção de sacarose foi de 0,19 $g.L^{-1}$. Porém, a viscosidade média encontrada para a sacarose é maior que os demais meios e consequentemente, a sua produtividade também é maior. Por isto, é o substrato mais utilizado na indústria.

Apesar do substrato sacarose possuir valores superiores de viscosidade e produtividade, percebe-se que os meios alternativos, leite de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar também podem ser utilizados para a utilização em diversas indústrias em relação as suas necessidades.

Os modelos cinéticos estudados conseguiram descrever o comportamento da produção de goma xantana utilizando os dados experimentais para as equações de Verhulst e de Monod, e desta forma, foram comparados os resultados. Observou-se um melhor ajuste do modelo de Verhulst se comparado com o modelo de Monod, tanto no modo batelada como no modo contínuo. Foi possível também estimar os parâmetros cinéticos: $\mu_{máx}$ (0,49 h^{-1}), *Yx/s* (3,35 g_{cel}/g_{sac}), *Yx/p* (14,00 g_{cel}/g_{xant}) e *Yp/s* (0,239 g_{xant}/g_{sac}).

Apesar da Transformada Z não ser comumente utilizada em processos fermentativos, esta pode ser aplicada no bioprocesso em estudo.

Esses resultados indicam que é possível produzir goma xantana a partir dos substratos alternativos, sendo o Brasil o maior produtor de cana-de-açúcar e o segundo na produção de mandioca e, desta forma, apresenta condições da produção desta no país.

7. TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo da produção de goma xantana utilizando substratos alternativos provenientes da agroindústria, seria interessante a realização de mais planejamentos experimentais a fim de se encontrar as melhores condições de produção do biopolímero utilizando bagaço de cana-de-açúcar e biomassa de malte. Seria interessante também a realização da caracterização do biopolímero formado através de sua estrutura química, contendo o percentual de acetil e piruvato, além de seu peso molecular via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, a realização da análise termogravimétrica da xantana e análises das enzimas que a bactéria produz durante a fermentação.

Comparar as xantanas produzidas com os meios alternativos com a goma xantana comercial, a fim de melhorar o processo fermentativo e destiná-lo à indústria.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, T. N. **Substitutos de leite animal para intolerantes à lactose**. Universidade de Brasília, 2013.

ABDEL-FATTAH, Y. R; SAEED, H. M.; GOHAR, Y. M.; EL-BAZ, M.A. Improved production of Pseudomonas aeruginosa uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1707-1714, 2005.

AGOSTINI, M. R. **Produção e utilização de farinha de mandioca comum enriquecida com adição das próprias folhas desidratadas para consumo alimentar**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Energia na Agricultura) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis of AOAC International. 16. ed., Maryland: **Gaithersburg**, 1997.

BAIOCCO, L. **M. Estudo de Parâmetros para a Produção de Inóculos Liofilizados de *X. campestris* pv. Manihotis**. Unicamp, São Paulo, 1997.

BATTISTELLE, R. A. G., MARCILIO, C., LAHR, F. A. R. Emprego do bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e das folhas caulinares do bambu da espécie *Dendrocalamus giganteus* na produção de chapas de partículas. **Revista Minerva**, v.5, n.3, p. 297-305, 2008.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 145-152, 1998.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.29, n.2, p.171-188, 2008.

BRANDÃO, L. V. **Goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel: produção, caracterização e aplicação para fluido de**

perfuração de poços de petróleo. 184 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

BRANDÃO, L. V., NERY, T. B. R., MACHADO, B. A. S., ESPERIDIÃO, M. C. A., DRUZIAN, J. I. Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. Campinas: **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 217-222, 2008.

CANUTO, A.P. **Desenvolvimento de Bioprocesso para produção de Goma Xantana por Fermentação no Estado Sólido a partir de Resíduos e Subprodutos Agroindustriais.** 89 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

CERVBRASIL. **Associação Brasileira da Indústria da Cerveja.** 2015. Disponível em: < http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php?page=dados-do-setor>. *Acessado em: agosto, 2016.*

CHISTÉ, R. C., COHEN, K. O., MATHIAS, E. A., RAMOA JÚNIOR, A. G. A. Estudo das propriedades físico-químicas e microbiológicas no processamento da farinha de mandioca do grupo d'água. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2,p. 265-269, 2007.

COMPANHIA DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira:** cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2013. (Conab) – Brasília: Conab 2016. Disponível em: <www.conab.gov.br/>. *Acessado em: agosto, 2016.*

COSTA, M. R. M. F. **Produção de goma xantana a partir de soro de leite.** 52 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Universidade Federal de São João Del-Rei, Ouro Branco, 2014.

DA SILVA, R. S. Cinética de crescimento de fungos: I. Modelo matemático para o *Eremothecium ashbyii*. **Semina: Ciências Rurais e de Tecnologia**, Londrina, v.8, n.2, p. 199-201, 1981.

DINIZ, D. M.; DRUZIAN, J. I.; AUDIBERT, S**.** Produção de goma xantana por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* a partir de casca de cacau ou soro de leite. **Revista Polímeros**, v.22, n.3, p. 278-281, 2012.

DORAN, P. M. Bioprocess Engineering Principles. 1.ed. Elsevier Science & Technology Books - **Academic Press**, 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Embrapa). 2013. **Mandioca**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mandioca>. *Acessado em: abril, 2016.*

ERNESTO, V. A. R. T. **Caracterização térmica do bagaço de cana-de-açúcar. Visando aproveitamento energético.** 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

FARIA, S. **Produção de goma xantana empregando caldo de cana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* NRRL B-1459.** 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

FELIPE, F. I., RIZATO, M., WANDALSEN, J. V. Potencial econômico dos resíduos de mandioca provenientes de fecularias no Brasil. **47° Sober (Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural) Congresso**, Porto Alegre, 2009.

FERNANDES, L. A.; NASCIMENTO, R. C. A. M; AMORIM, L. V. Avaliação o desempenho da goma xantana como controlador reológico em fluidos salgados. **20° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais**. Joinville, 2012.

FERRARI, F. C. dos S. **Fatores Operacionais e Cinética do Processo Fermentativo para Otimização da Produção de Etanol em Escala Industrial**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Departamento de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

FORNARI, R. C. G. **Aproveitamento de soro de queijo para a produção de goma xantana.** 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, 2006.

FOX, R. W.; McDONALD, A.T; PRITCHARD, P. J. Introduction to Fluid Mechanics. 6. ed. EstadosUnidos: **John Wiley & Sons**, Inc., 2004.

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

GOWDHAMAN, D.; PADMAPRIYA, S.; PONNUSAMI, V. Effect of Citric Acid Inducer on Xanthan Gum Production from Cassava Bagasse, a Potential Agro-Industry Waster. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.** v. 4, p. 370 – 375, 2013.

GOMES, G. V. P., ASSIS, D. J., SANTOS-EBINUMA, V. C., RIBEIRO, P. L. L., DRUZIAN, J. I. Influência da aeração e agitação na produção, viscosidade e massa molecular das gomas xantana obtidas a partir do bagaço de cana. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos, XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa.** Fortaleza, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. 2009. Tabelas de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil.** Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_composicao_nutricional/>. *Acessado em: dezembro de 2015.*

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 3. ed. New York: **Worth Publishers**, 2002.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial. Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: **Edgard Blucher LTDA.**, v.3, 2001.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Revista Estudos tecnológicos em engenharia**, v.5, n.1, p. 50-67, 2009.

LUVIELMO, M. M.; VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n.2, p. 161-172, 2007.

MARCOTTE, M. HOSHAHILI, A. R. T.; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International.** v. 34, p.695-703, 2001.

MECCA, J. S. **Obtenção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de queijo: Estudo da produção e modelagem matemática.** 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, 2006.

MENEZES, J. D. de S. **Produção de goma xantana a partir da bioconversão de resíduos de malte de cervejaria por *Xanthomonas campestris pv. campestris* IBSBF 1866.** 119 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

MENEZES, J. D. S.; DRUZIAN, J. I.; PADILHA, F. F.; DE SOUZA, R. R. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.8, n.8, 2012.

MESOMO, M. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais.** 105 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MESOMO, M. C.; SILVA, M.F ; BONI, G. ; PADILHA, F.F; MAZUTTI, M.; MOSSI, A.; OLIVEIRA, D. ; CANSIAN, R. L; LUCCIO, M. D.; TREICHEL, H. Xanthan gum produced by Xanthomonas campestris from cheese whey: production optimisation and rheological characterization. **Journal of the science of food and agriculture**, n.89, p. 2440–2445, 2009.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA), 2003. **Potencialidades regionais. Estudo de viabilidade econômica, Amido de mandioca**. Disponível em: <www.suframa.gov.br>. *Acessado em: novembro, 2015.*

MONOD, J. ***Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes***. *Hermann & Cie.* Paris, 1942.

MOTHÉ, C. G.; CORREIA, D. Z. Caracterização reológica de blendas de gomas cajueiro e xantana em suco. **Revista Analytica**, n.2, 2002.

NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Revista Química Nova**. v.31, n.8, p. 1937-1941, 2008.

NOGUEIRA, M. A. F. S., GARCIA, M. S. Gestão dos resíduos do setor industrial sucroenergético: estudo de caso de uma usina no município de Rio Brilhante, Mato Grosso do Sul. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental.** v.17, n.17, p. 3275 – 3283, 2013.

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

PHILLIPS, C. L.; PARR, J. M., ROSKIN, E. A. Signals, Systems, and Transforms. 4. ed., New Jearsey: **Prentice Hall**, 2008.

PORTELA, R. B. FARIA, S., de RESENDE, M. M., CARDOSO, V. L. Modelagem da Produção de Goma Xantana por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Revista Horizonte Científico**, v.2, n.1, 2008.

RAMOS, B. F. M. **Produção de goma xantana em água produzida da indústria de petróleo.** 51 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) - Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

ROBAZZA, W.S.; TELEKEN, J. T; GOMES, G.A. **Modelagem Matemática do Crescimento de Microrganismos em Alimentos. Revista TEMA: Tend. Mat. Apl. Comput.**, v.11, n.1, p. 101-110, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos. 2. ed., Campinas: **Cárita**, 2009.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de Isolamento de Gomas Naturais: Comparação Através da Goma do Cajueiro (*Anacardium occidentale L.*). **Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia**. **v**.3, n.1, p. 31- 36, 1993.

ROLL, R. J.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. **Produção de xantana por *Xanthomonas campestris pv. pruni* em meios de cultura alternativos.** 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

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

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas sp* para produção de goma xantana.** 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2005.

SCHMIDELL, W ; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.. Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica. 1. ed., v.2, São Paulo: **Edgard Blücher LTDA**, 2001.

SELVI, V. VIJAYAGOPAL, V. Optimization of sugarcane bagasse hydrolysis and kinetic modelling of xanthan gum production using an isolated strain. National Conference on Green Engineering and Technologies for Sustainable Future-2014. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**. Special Issue 4, p. 95-99, 2014.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO (SEAB) – Departamento de Economia Rural (DERAL). **Análise da conjuntura agropecuária, Mandioca, Safra 2015/2016.** Paraná. Disponível em: < http://www.agricultura.pr.gov.br/>. *Acessado em: agosto de 2016*.

SLOUGHTER, D. **Difference Equations to Differential Equations.** An Introduction to Calculus. Chapter 1: Sequences, limits and difference equations. Department of Mathematics, Furman University, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MANDIOCA (SBM), 2010. **Mandiocultura**. Disponível em: <http://www.sbmandioca.org/pagina.php?id_menu_int=6&id_texto_int=80>. *Acessado em: abril, 2016.*

STEINBÜCHEL, A. Biopolymers. General aspects and special applications. v. 5, ch. 11, Weinnheim: **Wiley-VCH**, 2004.

TONIDANDEL, D. A. V. Decifrando a Transformada Z. **XVIII Congresso Brasileiro de Automática**, Bonito, 2010.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. L. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.

VALLE, T. L. Mandioca de mesa, macaxeira ou aipim: a hortaliça negligenciada pelo Brasil. **47º Congresso Brasileiro de Olericultura, IV Simpósio Brasileiro sobre cucurbitáceas**, Porto Seguro, 2007.

WEISS, R. M.; OLLIS, D. F. Extracellular Microbial Polysaccharides. I. Substrate, Biomass, and Product Kinetic Equations for Batch Xanthan Gum Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, p. 859-873, 1980.

ANEXO I – Curva padrão da dosagem de proteínas totais pelo Método de Lowry

A dosagem de proteínas é feita de acordo com os parâmetros da curva padrão. Abaixo, seguem as etapas para a construção da curva padrão e para a realização do procedimento de acordo com a Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1. Volume de água e BSA utilizados de acordo com a concentração de proteínas na curva padrão.

H_2O (µL)	**BSA** (µL)	**Concentração de proteínas** (mg/mL)
200	0	0
150	50	0,25
125	75	0,375
100	100	0,5
50	150	0,75
0	200	1

Tabela 2. Volume de água, BSA e reagentes utilizados para a curva padrão.

H_2O (µL)	**BSA** (µL)	**Reagente E** (mL)	**Reagente de Foulin-Ciocalteau** (µL)
200	0	2	200
150	50	2	200
125	75	2	200
100	100	2	200
50	150	2	200
0	200	2	200

A curva padrão desenvolvida pelo Método de Lowry encontra-se na Figura 1.

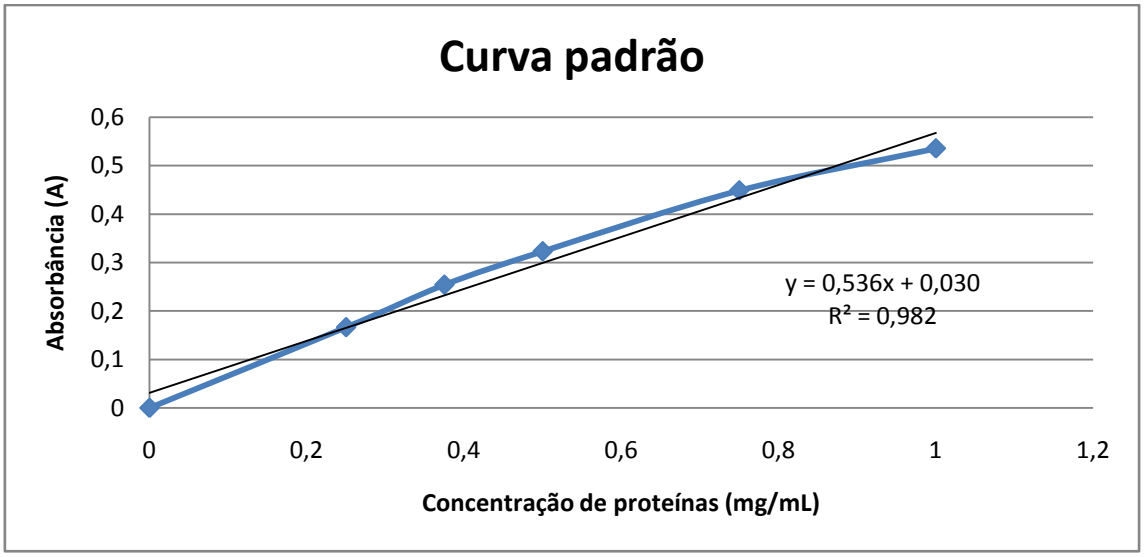


Figura 1. Curva padrão desenvolvida neste experimento.

A Tabela 3 apresenta os reagentes utilizados para a dosagem de proteínas totais para o experimento e a Tabela 4 os reagentes que compõem o reagente E.

Tabela 3. Reagentes utilizados

Reagentes
Reagente de Folin-Ciocalteau
Solução padrão de proteína (BSA 1 mg/mL).
Solução A (solução de sulfato de cobre 1% (p/v)).
Solução B (solução de tartarato de sódio e potássio 2% (p/v)).
Solução C (2% de carbonato de sódio + 0,1M NaOH)

Tabela 4. Reagente E

Reagentes	**Volume** (mL)
Solução A (solução de sulfato de cobre 1% (p/v)).	0,4
Solução B (solução de tartarato de sódio e potássio 2% (p/v)).	0,4
Solução C (2% de carbonato de sódio + 0,1M NaOH)	40

ANEXO II – Curva de contorno dos experimentos utilizando os substratos alternativos

Leite de mandioca:

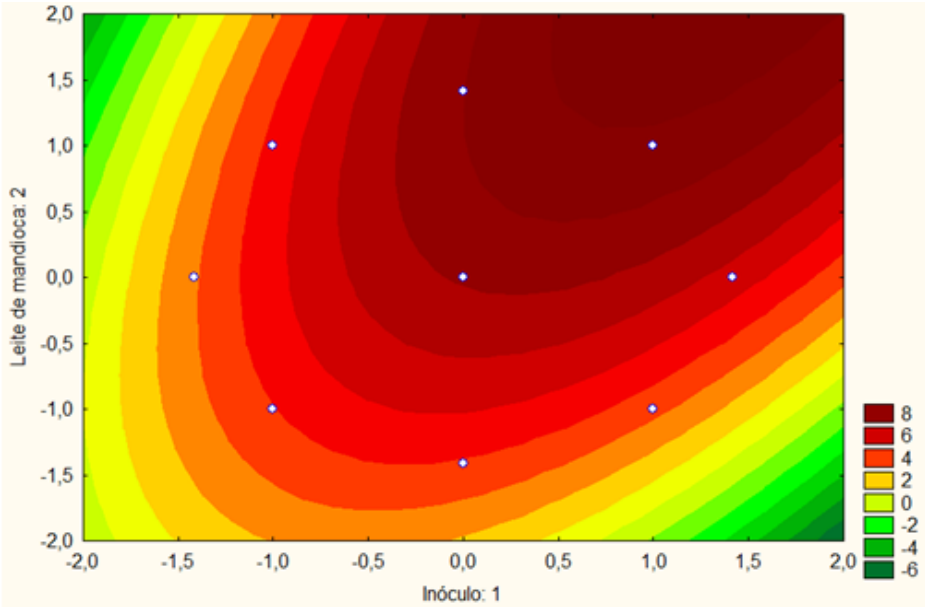


Figura 12. Superfície de resposta com o comportamento do rendimento da goma xantana em relação à concentração de leite de mandioca e inóculo.

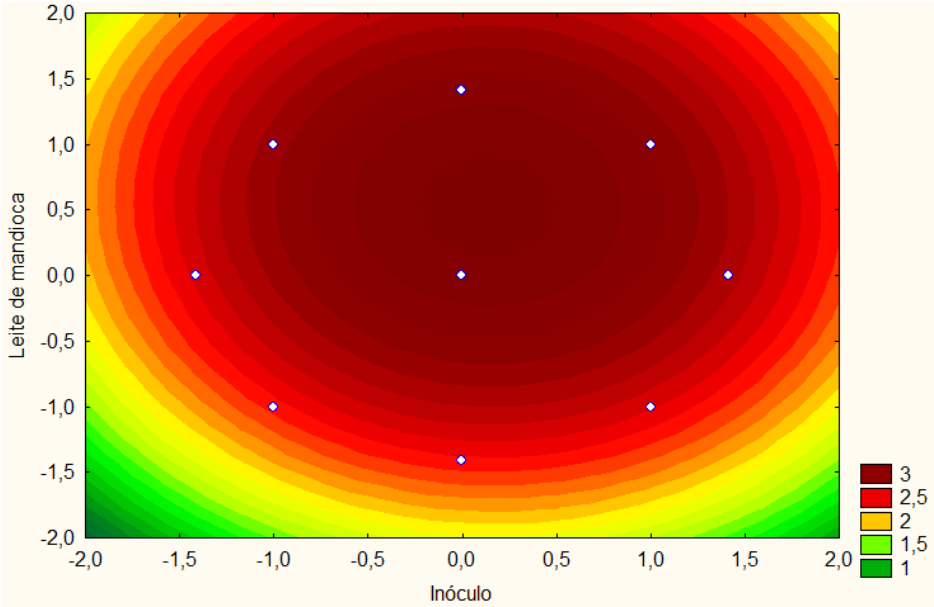


Figura 14. Superfície de resposta com o comportamento do rendimento da goma xantana em relação à concentração do volume de leite de mandioca e de inóculo.

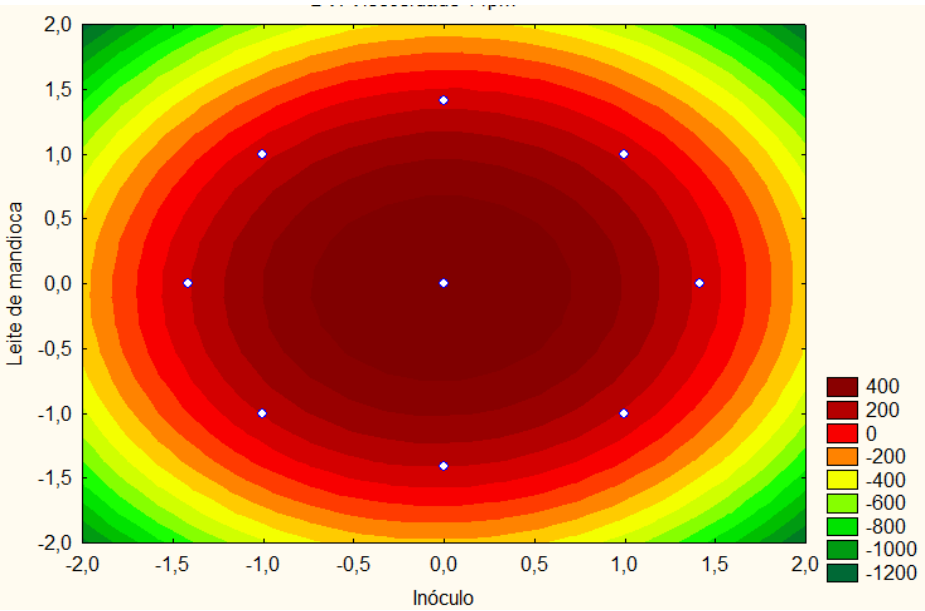


Figura 15. Superfície de resposta com o comportamento da viscosidade aparente da goma xantana em relação à concentração do volume de leite de mandioca e de inóculo.

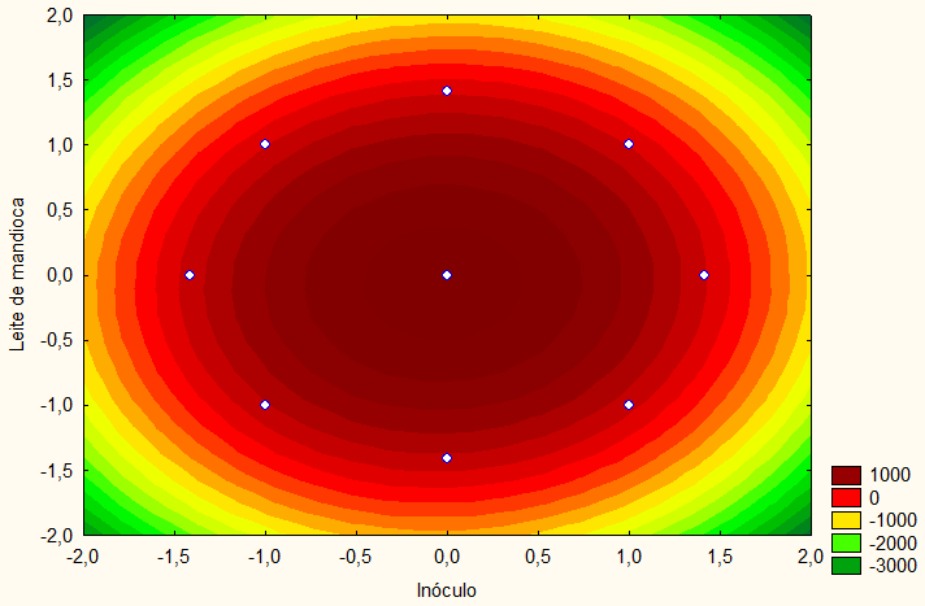


Figura 18. Superfície de resposta com o comportamento da produtividade da goma xantana em relação à concentração do volume de leite de mandioca e de inóculo.

Bagaço de cana-de-açúcar:

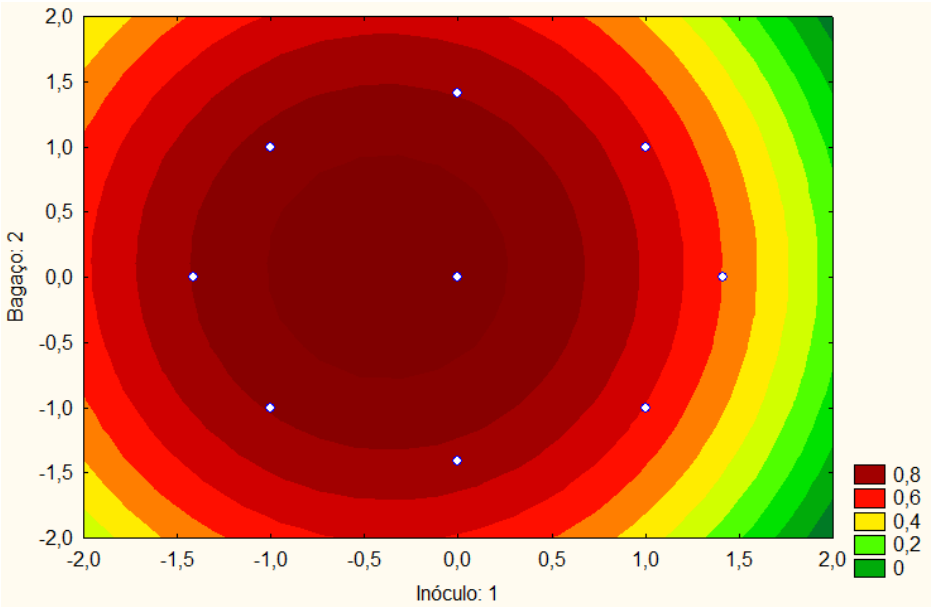


Figura 20. Superfície de resposta da variável rendimento da goma xantana em relação à concentração do bagaço de cana-de-açúcar e de volume de inóculo.

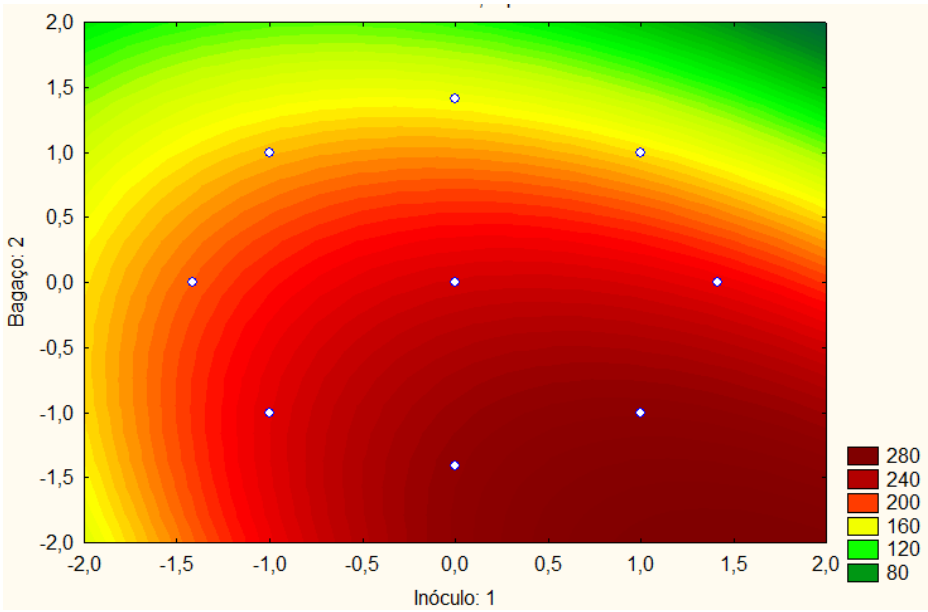


Figura 22. Superfície de resposta da variável viscosidade com rotação de 0,5 rpm da solução de goma xantana em relação à concentração do bagaço de cana-de-açúcar e de volume de inóculo.

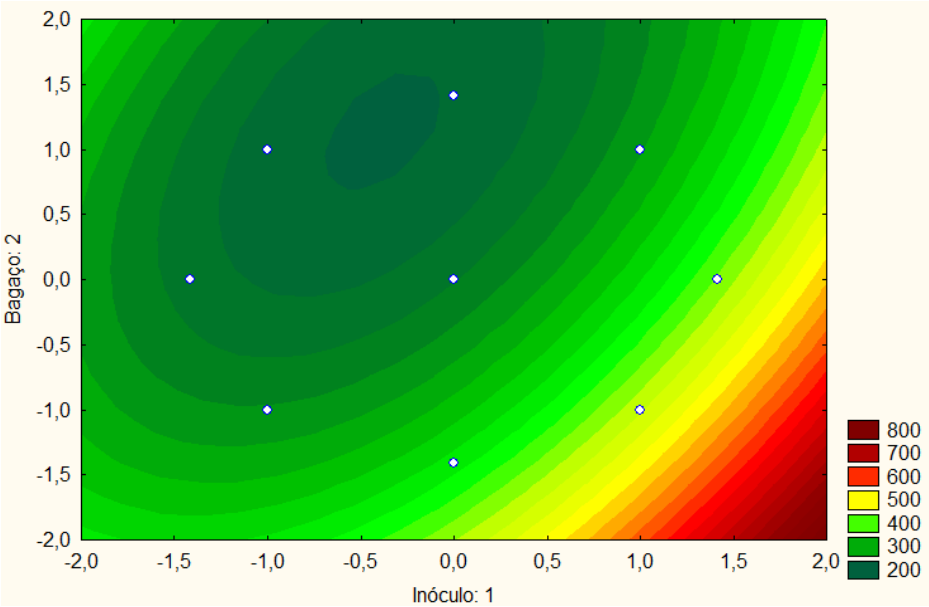


Figura 22. Superfície de resposta da variável viscosidade com rotação de 0,5 rpm da solução de goma xantana em relação à concentração do bagaço de cana-de-açúcar e de volume de inóculo.

Biomassa de malte:

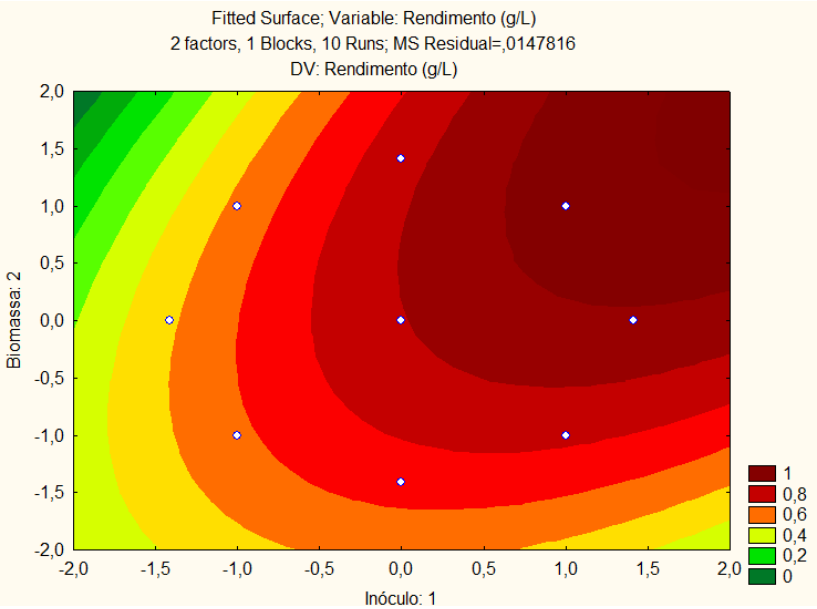


Figura 26. Superfície de resposta da variável rendimento da goma xantana em relação à concentração de biomassa de malte e de volume de inóculo.

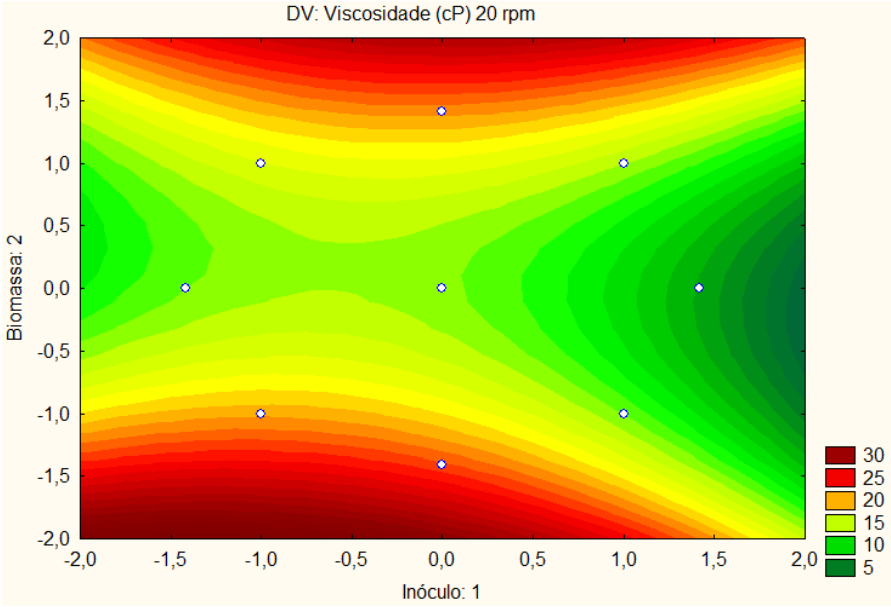


Figura 28. Superfície de resposta da variável viscosidade da goma xantana em relação à concentração de biomassa de malte e de volume de inóculo.

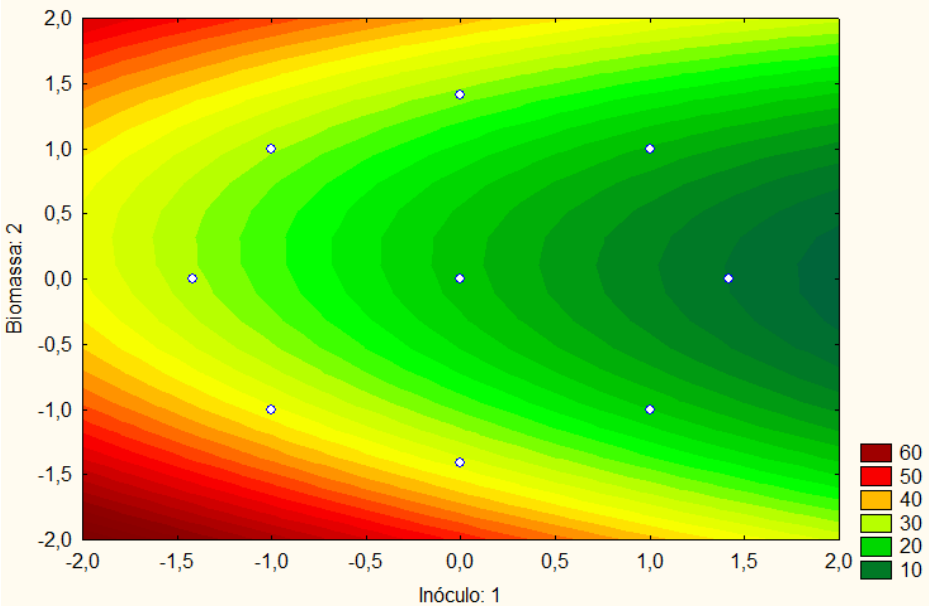


Figura 30. Superfície de resposta da variável produtividade da goma xantana em relação à concentração de biomassa de malte e de volume de inóculo.