



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0803131-2 A2**



* B R P I 0 8 0 3 1 3 1 A 2 *

(22) Data de Depósito: 20/05/2008

(43) Data da Publicação: 19/01/2010

(RPI 2037)

(51) *Int.Cl.:*

C12P 19/06 (2010.01)

(54) Título: **USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO, SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO GOMA XANTANA**

(73) Titular(es): Gleice Valéria Pacheco Gomes, Janice Izabel Druzian, Lillian Vasconcellos Brandão

(72) Inventor(es): Gleice Valéria Pacheco Gomes, Janice Izabel Druzian, Lillian Vasconcellos Brandão

(57) Resumo: USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO, SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO GOMA XANTANA. Utilizando biomassa de levedura proveniente dos processos industriais fermentativos, ricas em carboidratos complexos e/ou simples, além de outros nutrientes, na forma de sólidos, pastas, líquidos, ou outras formas, ou o conjunto desses resíduos suplementados ou não com outros nutrientes, com cepas de Xanthomonas para a produção de biopolímeros tipo goma xantana, utilizando reatores aerados e agitados. A invenção visa obter substratos alternativos de baixo custo para o processo fermentativo para a produção de polissacarídeo tipo goma xantana, quando comparado ao processo industrial de bioconversão de sacarose ou glicose. Esta invenção envolve a otimização dos parâmetros de composição do meio de cultivo com biomassa de leveduras e das condições de fermentação tais como pH, temperatura, tempo e velocidade de agitação, e a avaliação da necessidade de fonte adicional de nitrogênio, fósforo, potássio, ou outros nutrientes, no substrato fermentativo.

**USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO,
SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO
GOMA XANTANA**

5

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A presente Patente de Invenção refere-se à utilização da biomassa de levedura provenientes da fabricação de bebidas fermentadas e de álcool como substrato no processo fermentativo por *Xanthomonas* para obtenção de polímero tipo goma xantana.

As leveduras são classificadas como fungos unicelulares com reprodução
10 vegetativa por brotamento ou fissão. Elas crescem mais rapidamente que os bolores e são mais eficientes que estes na atividade metabólica, por causa de sua maior superfície. Sua distribuição é bastante ampla podendo ser encontrada, por exemplo, folhas, flores, frutos, solo, ar, lagos, rios, mares e até internamente em insetos e animais. Quanto ao gênero de leveduras, têm-se o gênero *Saccharomyces* que compreende várias espécies,
15 em especial a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que por ser uma fonte de muitos nutrientes oriundos do malte, assegura as proteínas necessárias com todos os aminoácidos (Phaff, H. J.; Starmer, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil, p. 123-180. In A. H. Rose & J. S. Harrison (eds.), The yeasts. London, Academic Press, 508 p., 1987).

20 O Brasil produz atualmente uma grande quantidade de biomassa de levedura, principalmente como subproduto das indústrias de cerveja e das destilarias produtoras de etanol. O setor de álcool tem uma produção anual de aproximadamente 240 mil ton (Furco, A. M. A produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. Anais do "workshop" sobre produção de biomassa de levedura. Campinas: Instituto de
25 Tecnologia de Alimentos, p. 52-58, 1996), enquanto que o setor cervejeiro contribui

com cerca de 4.000 ton/ano (Peixoto, N. Processamento de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial, mercado interno e externo. Anais do "workshop" sobre produção de biomassa de levedura. Campinas: **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, p. 90-98, 1996).

- 5 A fermentação alcoólica gera biomassa de levedura residual de alta qualidade, que após o processo de secagem, pode ser utilizado como um valioso ingrediente na alimentação animal (Peixoto, N. Processamento de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial, mercado interno e externo. Anais do "workshop" sobre produção de biomassa de levedura. Campinas: **Instituto de Tecnologia de**
- 10 **Alimentos**, p. 90-98, 1996). A levedura inativada pela ação do calor, também é usada como fonte de nutrientes em alimentação animal e humana, tanto na forma de levedura íntegra ou de derivados de levedura (Dziezak, J. Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics, and processing. Chicago: **Food Technology**, v. 41, n. 2, p. 104-121, 1987a; Dziezak, J. Yeasts and yeast derivatives: applications. Chicago: **Food**
- 15 **Technology**, v. 41, n. 2, p. 122-125, 1987b; Halásy, A., Lásztity, R. Use of yeast biomass in food production. Boca Raton: **CRC Press**, 312p., 1991).

Portanto, nas destilarias de álcool etanólico, nas cervejarias e na produção de vinhos são gerados excedentes de células de levedura que, inativadas termicamente ou não, poderão ser usadas diretamente (células íntegras de levedura) ou ser processadas

20 para obtenção de vários derivados. As células íntegras são usadas principalmente na alimentação animal, enquanto certos derivados como o autolisado e o extrato de levedura vêm sendo utilizados de longa data na formulação de produtos para humanos, como complemento nutritivo e flavorizante. Existem estudos para o melhoramento de produtos utilizando a levedura de cerveja. A patente **PI0412657-2** trata da adição de

25 extrato de levedura para melhorar o sabor de alimentos ou bebidas com quantidade de

gordura total reduzida. A invenção **PI0103733-1** relata a utilização da levedura e seus derivados na encapsulação de ingredientes alimentícios na forma de uma dispersão de levedura inativa ou seus derivados ou suas misturas em um meio aquoso.

O uso e a importância do uso de derivados de levedura, como ingredientes com
 5 função de flavorizante e complemento nutritivo dos alimentos, têm sido bastante enfatizados na literatura (Dziezak, J. Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics, and processing. Chicago: **Food Technology**, v. 41, n. 2, p. 104-121, 1987a; Dziezak, J. Yeasts and yeast derivatives: applications. Chicago: **Food Technology**, v. 41, n. 2, p. 122-125, 1987b; Camerón, D. R., Cooper, D. G., Neufeld, R.
 10 J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Washington DC: **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988; Halász, A., Lásztity, R. Use of yeast biomass in food production. Boca Raton: **CRC Press**, 312p., 1991; Belem, M. A. F., Lee, B. H. Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. London: **Food Science and**
 15 **Technology International**, v. 3, n. 6, p. 437-444, 1997; Belem, M. A. F., Lee, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. Cleveland: **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 7, p. 565-598, 1998).

Além de apresentar elevado teor de carboidratos (60 a 90%) e proteína (30% a
 20 70%), as leveduras de *S. cerevisiae* são ricas em vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), em minerais essenciais, e microelementos, particularmente selênio. A fibra dietética é representada por carboidratos da parede celular, principalmente por mananas e glicanas. As glicanas e as mananas representam 30 a 45% do peso seco da parede celular de levedura de cervejaria
 25 (Macwilliam, I. C. The structure, synthesis and functions of the yeast cell wall - A

review. London: **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, n. 6, p. 524-535, 1970; Rose, A. H. Composition of the envelope layer of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 1105-1185, 1993; Reed, G., Nagodawithana, T.W. Yeast technology. New York: **Van Nostrand Reinhold**, 378p., 1991). Segundo o Instituto Cubano (Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar. Manual de los derivados de la caña de azúcar. México: **GEPLACEA/PNUD**, 252p., 1988), de todas as leveduras, a do gênero *Saccharomyces* é a de maior valor industrial e comercial, devido ao seu alto teor de lisina.

Recentemente, tem havido uma forte tendência de explorar comercialmente as leveduras, através do isolamento de alguns de seus principais constituintes como enzimas (invertase, lactase) nucleotídeos, proteínas (manoproteínas), polissacarídeos (glicana, manana), além de lipídios, como fosfolipídios e ergosterol (Camerón, D. R., Cooper, D. G., Neufeld, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Washington DC: **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988; Kollar, R., Sturdik, E., Sajbidor, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. New York: **Food Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 225-237, 1992; Belem, M. A. F., Lee, B. H. Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. London: **Food Science and Technology International**, v. 3, n. 6, p. 437-444, 1997; Belem, M. A. F., Lee, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. Cleveland: **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 7, p. 565-598, 1998). Esses componentes, quando isolados, apresentam propriedades específicas de grande interesse na área de Ciência de Alimentos e em Nutrição. O levedo de cerveja tem funções específicas no organismo, mediadas por seus componentes para o corpo

humano. A biomassa de levedura exerce uma ação antioxidante, prolongando a vida-de-prateleira de alguns sistemas alimentares, quando estocados à temperatura de refrigeração ou congelamento, particularmente em sistemas ricos em gorduras insaturadas (Schackelford, J. R., Murray, D. G. Studies show no shelf-life loss from
5 usual food yeasts in products. Chicago: **Food Product Development**, v. 14, n. 9, p. 40, 1980).

Entretanto, alguns fatores limitam o uso de leveduras para o consumo humano, dentre os quais: a presença de parede celular espessa e rígida resistente à ação de enzimas digestivas e o alto conteúdo de ácidos nucléicos (Snyder, H. E. Microbial
10 sources of protein. New York: **Advances in Food Research**, v. 18, p. 85-91, 1970; Galvez, A., Ramírez, M. J., Garcia-Garibay, M. Chemical composition of a mixture of single cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. Guatemala: **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 40, n. 2, p. 252-262, 1990). A ingestão de altas quantidades de ácidos nucléicos leva à acumulação de ácido úrico, que pode
15 cristalizar-se nos tecidos e órgãos, causando a formação de cálculos no tecido urinário e deposição de cálcio nos tecidos (Lyutskanov, N., Koleva, L., Stateva, L., Venkov, P., Hadjiolov, A. Protein extracts for nutritional purposes from fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae*: reduction of nucleic acid content and applicability of the protein extracts. Berlin: **Journal of Basic Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 523-528, 1990).
20 Foi demonstrado que isolados protéicos obtidos a partir de células de leveduras pode ter melhor qualidade nutricional do que as células íntegras, porque o seu conteúdo de ácidos nucléicos, a presença de componentes ativos indesejáveis e o efeito deletério da parede celular sobre a biodisponibilidade de nutrientes são atenuados (Rosales, F. H. Yeast as protein source for human nutrition. A review. Budapest: **Acta Microbiology of**
25 **the Academy of Science of Hungary**, v. 31, n. 3, p. 159-172, 1984).

Por estas razões, associadas ao alto volume de biomassa de levedura gerada com o incremento do setor de bebidas fermentativas e principalmente do setor de produção álcool, é importante o desenvolvimento de métodos de processamento desta biomassa, que permitam gerar produtos alternativos de alto valor agregado.

5 Com o objetivo de melhor avaliar o potencial alimentício da biomassa de levedura resultante da indústria de cervejas, vinhos e de etanol, algumas pesquisas alternativas têm sido realizadas (Sgarbieri, V. C., Alvim, I. D., Vilela, E. S. D., Baldini, V. L. S., Bragagnolo, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces sp.*) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. Campinas: **Brazilian Journal**
10 **of Food Technology**, v. 2, n. 5, p. 119-125, 1999). Por ser uma fonte de carbono, a biomassa de levedura resultante da produção de álcool, de cerveja, de vinho, etc suplementada ou não, pode ser usada como macro e micronutrientes alternativos na fermentação por *Xanthomonas campestris* para produzir o biopolímero tipo goma xantana com bons rendimentos. Esta possibilidade tem as vantagens adicionais de
15 utilizar um subproduto que apresenta um baixo valor comercial, ser obtido de fontes renováveis e gerado em grande quantidade no país e que apresenta grandes problemas para o descarte ou utilização.

A goma xantana é um heteroexopolissacarídeo produzido por fermentação aeróbica por *Xanthomonas*, importante do ponto de vista comercial devido a sua ampla
20 utilização nas indústrias de alimentos, farmacêutica, e petroquímica (Casas, J. A., Santos, V. E., Garcia-Ochoa, F. Xanthan Gum Production Under Several Operations Conditions: Molecular Structure and Rheological Properties. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 26, p. 282-291, 2000). O processo de produção do polissacarídeo goma xantana é realizado tradicionalmente através da fermentação em meio contendo glicose
25 e/ ou sacarose como fontes de carbono, suplementado com fontes de nitrogênio e sais

minerais e outros nutrientes, geralmente por bactérias da espécie *Xanthomonas campestris*.

Desde sua introdução em 1964, a goma xantana tem sido muito usada na indústria devido à sua viscosidade e propriedades reológicas únicas. Da produção anual de 30.000 toneladas, apenas 5.000 são usadas como fluido na indústria de petróleo. O consumo de goma xantana nos E.U.A tem crescido anualmente entre 5 a 10%, entretanto somente é viável comercialmente como grau alimentício e farmacêutico, devido principalmente ao alto custo da fonte de carbono utilizada na fermentação (Stredansky, M., Conti, E. Xanthan Production by Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, n. 34, p. 581-587, 1999; Yoo, S. D., Harcum, S. W. Xanthan Gum Production from Waste Sugar Beet Pulp. **Bioresource Technology**, n. 70, p. 105-109, 1999). Na indústria química e de petróleo, o produto é considerado estratégico por ser utilizado na lubrificação das brocas de perfuração e também na recuperação secundária de poços de petróleo, processos já utilizados na Arábia Saudita e na China e, adotados experimentalmente pela Petrobrás.

No Brasil, a demanda pelo produto é de 3,5 mil toneladas anuais (<http://www.assintecal.org.br>, acessada em março 2007), e importadas da China ou dos E.U.A que utilizam glicose resultante da hidrólise do amido do milho como fonte de carbono no processo fermentativo. Ainda não se conhece uma produção economicamente viável de goma xantana por fermentação de substratos alternativos. Entende-se que para viabilizar qualquer processo produtivo industrial é necessário baixar os custos da matéria prima e de produção, sem prejuízo a qualidade do produto final. Uma alternativa é a utilização de substratos baratos, que atendam as características necessárias.

Devido ao mercado crescente de polissacarídeos de alto valor agregado como goma xantana, estudos estão sendo realizados com o objetivo de aproveitar os rejeitos ou subprodutos industriais no processo fermentativo, como resíduos da agroindústria de frutas (**PI0701765-0**; DRUZIAN, J. I., PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 787-792, 2007; WOICIENCHOWSKY, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais e de mandioca**. Curitiba: Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2001), entretanto não existe nenhum relato científico ou patentário de bioconversão de biomassa de levedura em polissacarídeo tipo goma xantana.

A presente invenção relata que a utilização da biomassa da biomassa de levedura resultante da produção de cerveja, de álcool, de vinho, etc., permite obter substratos fermentativos alternativos de baixo custo para produção de polissacarídeo tipo goma xantana. Além de serem resíduos ou subprodutos obtidos de fontes renováveis, possuem baixo custo por ser de difícil descarte ou utilização e gerados em grande quantidade no país, e podem constituir, quando complementados convenientemente com sais e nutrientes (geralmente uma fonte de nitrogênio e fósforo), um substrato alternativo viável para a produção de polissacarídeo tipo goma xantana por fermentação, o que abre uma nova fonte de uso desse material e uma nova fonte de renda para o setor.

As patentes oriundas do Brasil, **PI0406309-0**, **PI0302205-6**, **PI8200767-5**, e de outros países como a **PT74943** e **JP11116603**, são algumas das que citam a produção de goma xantana, a otimização do processo produtivo, medidas de viscosidade da goma e teor de piruvato contido, entretanto todas as citações utilizaram sacarose e glicose como fonte de carbono na obtenção da goma xantana. Todas elas apresentam a desvantagem competitiva de produzir goma xantana com um alto custo, tornando

inviável principalmente sua utilização na indústria química e principalmente de petróleo que necessita de grandes quantidades para extração terciária de óleo (EOR). Isto porque, as fontes de carbono utilizadas possuem alto valor agregado, uma vez que são comercialmente aproveitadas e destinadas à fabricação de alimentos e álcool.

5 A patente **US4071406** trata da produção de polissacarídeo por *Xanthomonas* utilizando soro de soja como substrato. Esse resíduo da agroindústria de grãos é gerado em grandes quantidades e ainda não possui valor comercial agregado, no entanto, o autor suplementa o soro de soja com glicose e sacarose como meio nutritivo para a produção de goma xantana, o que apresenta a desvantagem de utilizar um produto de
10 alto custo para suplementação, que encarece o produto final.

 A patente **US5434078** aborda a produção de goma xantana por diferentes linhagens de *Xanthomonas* utilizando produtos residuais derivados do leite, no entanto faz o enriquecimento do meio nutritivo com um produto Sigma contendo lactose, vitaminas, proteínas, lipídios e minerais, com a desvantagem de utilizar um composto
15 industrializado para a obtenção de biopolímeros, o que poderá encarecer o produto final além de não agregar valores ambientais.

 A patente, depositada no Brasil, **PI0007342-3** ressalta a produção de goma xantana por fermentação de mandioca, batata e resíduos da agroindústria cafeeira, no entanto, o hidrolisado da casca de café contém quantidades variáveis de cafeína, ácido
20 caféico, ácidos clorogênicos e taninos, que por serem substâncias tóxicas e recalcitrantes, inibem o crescimento microbiano sendo necessário à remoção destes através de processos de separação, apresentando a desvantagem de agregar custos ao produto final.

 A patente **PI0701765-0** trata da utilização de resíduos da agroindústria de frutas,
25 que contenham carboidratos complexos (polissacarídeos: celulose, amido, fibras, etc) ou

carboidratos simples (açúcares livres) como compostos majoritários, para serem utilizados no meio de cultura/substrato do processo fermentativo com *Xanthomonas* para produção de polímero tipo goma xantana, apresentando a desvantagem de agregar custos ao produto final.

5

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta patente tem a vantagem de inventar uma nova utilização para a biomassa de levedura de cerveja, de vinho e de álcool, assim como de qualquer outro produto, provenientes do processamento industrial da cerveja, de vinho e de álcool ou de outras fontes, que são fontes renováveis e possuem baixo valor econômico agregado, visto que esta biomassa residual são gerados em grande quantidade no Brasil e de difícil descarte.

Uma dificuldade apresentada por esta invenção é que esta biomassa, por ser proveniente de resíduo industrial com processos diferenciados entre as indústrias e devido à biodiversidade entre as diferentes espécies de matérias primas do setor, podem possuir diferenças no teor de compostos a serem bioconvertidos por *Xanthomonas* precisando ser mensurado caso a caso o respectivo rendimento e/ou propriedades reológicas do polissacarídeo tipo goma xantana obtido em cada caso.

20

DESCRIÇÃO DETALHADA DO PROCESSO

A invenção consiste na utilização de resíduo industrial, da biomassa de levedura de cerveja, de vinho, de álcool, ou de qualquer outro produto, provenientes da produção de cerveja, de vinho, de álcool, ou de outras fontes, para produção de goma xantana por fermentação. A invenção envolve a otimização dos parâmetros da composição do meio

25

de cultivo e do processo fermentativo de produção da goma xantana a partir da variação da concentração de resíduo industrial, biomassa de levedura, bem como a variação de outras fontes de nutrientes (fonte de nitrogênio e fonte de fósforo) e condições de fermentação (tempo, temperatura e rotação).

5 Conforme a invenção, as cepas de *Xanthomonas* utilizadas no processo fermentativo são capazes de produzir polímeros tipo goma xantana com características reológicas comerciais a partir da biomassa de levedura oriunda de diferentes fontes.

 A cepa de *Xanthomonas* é mantida, por repicagem por período que pode ser de 3 a 15 dias, em tubo inclinado, em meio contendo YM ágar, incubada em
10 temperatura entre 25 a 32°C por 12 a 48 horas.

 A produção parte inicialmente da preparação de um inóculo de células jovens (10-20h) em agitador orbital, com temperatura entre 25 e 32°C, de 24 a 48 horas e agitação entre 60 e 300 rpm, em meio líquido contendo açúcares redutores em glicose (0,5 a 2,5%), extrato de malte (0,1 a 1,0%), extrato de levedura (0,1 a 1,0%) e peptona
15 bacteriológica (0,1 a 1,5%), direcionado ao aumento do número de células de *Xanthomonas*.

 Os meios de produção utilizados como substratos no processo fermentativo, direcionado para a produção de biopolímero, são compostos por biomassa de levedura.

 O crescimento microbiano é diretamente influenciado pela fonte de nitrogênio
20 empregada no processo fermentativo. Algumas fontes de nitrogênio podem ser empregadas como, por exemplo, sais de amônio orgânico e inorgânico, cloreto ou sulfato de amônio, peptona, extrato de malte, uréia, extrato de levedura, levedura de cerveja ou álcool (*Saccharomyces cerevisiae*) que podem ser usadas separadamente ou associadas. Esta invenção prefere que seja usada como fonte de nitrogênio no processo
25 de produção de polímeros tipo goma xantana, nitrato de potássio ou uréia.

A produção de polímeros tipo goma xantana, em fermentação líquida, se dá pela transferência da solução de inóculo para o meio de produção, na proporção de 5 a 25% em volume. O meio fermentativo de produção do biopolímero utilizado é composto basicamente de 0,5 a 10% de biomassa de levedura; puro e/ou impuro; em pó ou outras
5 formas, com pH ajustado entre 3,0 e 11,0 que podem ou não ser complementados com fonte de nitrogênio (0,0 a 2,5%) e fonte de potássio (0,0 a 1,5%), inoculados e incubados entre 25 e 32°C em agitador orbital com rotação entre 60 e 1500 rpm, durante 48 a 144 horas.

Os polímeros tipo goma xantana são solúveis em água e elevam
10 substancialmente a viscosidade do meio. A separação das células de *Xanthomonas* do polímero sintetizado pode ser realizada se necessária por centrifugação (3000 a 18000 rpm, -5 a 30°C, por 5 a 80 minutos). A extração do polímero do caldo de fermentação é feita com solventes orgânicos, preferencialmente por precipitação do polímero com volume apropriado de álcool etílico (1:1 a 1:6 v/v). A goma precipitada pode ser
15 removida por filtração, secada por diferentes técnicas e triturada para obtenção de um pó granulado. O álcool utilizado no processo para precipitar a goma xantana produzida, pode ser recuperado por destilação.

EXEMPLO 1

20 Como referência demonstrativa e não restritiva, foi utilizada biomassa de levedura de cerveja inativada da marca “mãe terra” obtida em supermercados da cidade de Salvador-Bahia e a biomassa de levedura de álcool doada pela Agroindústria do Vale do São Francisco S.A (Agrovale), empresa produtora de açúcar e álcool, situada na região do sub-médio São Francisco, em Juazeiro-Bahia. As cepas de *Xanthomonas* utilizadas

foram doadas da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico – IBSBF, Campinas-SP.

EXEMPLO 2

- 5 Como referência demonstrativa e não restritiva, as cepas dos microrganismos usados na produção de polímeros tipo goma xantana, para não perder sua viabilidade, foram conservadas por repicagem a cada 3 a 15 dias, em tubos contendo meio de cultura sólida YM ágar, incubados em temperatura entre 25 a 32°C por 24 a 48 horas. Para a propagação celular foi produzida inicialmente uma solução inóculo de células das cepas
- 10 com idade de 24 a 48 horas em meio YM líquido (sem ágar) e colocado em agitador orbital na temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitação de 60 e 1000 rpm.

EXEMPLO 3

- Como referência demonstrativa e não restritiva, uma solução aquosa contendo 0,5 a
- 15 10% da biomassa de levedura sólida na forma de pó, para cada uma das biomassas de leveduras testadas independentemente, obtidos de acordo com EXEMPLO 1, são transferidas para um frasco erlenmeyer de 250 mL e submetidos à agitação para obtenção da máxima dissolução e/ou absorção de água.

20 EXEMPLO 4

- Como referência demonstrativa e não restritiva 50 a 120 mL do homogeneizado produzido de acordo com o EXEMPLO 3, são distribuídos em frascos erlenmeyer de 250mL e adicionado 0,0 a 2,5% de uréia (fonte de nitrogênio) e 0,0 a 1,5% de K_2HPO_4 (fonte de potássio e fósforo). O pH do meio pode ser ajustado variando de 3,0 a 11,0
- 25 dependendo da composição de cada meio e das características genéticas de cada cepa.

Os frascos são então esterilizados em autoclave a 100 a 140°C por 15 a 50 min. Após resfriar a solução, os frascos são inoculados com volume de 5-25 mL de células de *Xanthomonas* preparada conforme o EXEMPLO 2, e fermentados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 a 144 horas, em condições de agitação 200 a 1000 rpm. A goma xantana produzida é precipitada com 1:1 a 1:6 (v/v) de álcool etílico comercial e seco em estufa ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24 a 72 horas até peso constante. Utilizando a biomassa de levedura de cerveja obteve-se de 9,37 a 15,09 g/L de polissacarídeo tipo goma xantana e, utilizando a levedura de álcool obteve-se 1,34 a 4,34g/L de polissacarídeo tipo goma xantana, dependendo da cepa de *Xanthomonas* utilizada, da composição do meio (quantidade de levedura e suplementação) e das condições de fermentação. Estes valores foram de 1 a 50 vezes maiores que os obtidos para produção de goma xantana a partir de sacarose como fonte de carbono no meio fermentativo, nas mesmas condições de produção. Os biopolímeros produzidos apresentaram coloração de pardo a escura, mostrando que os pigmentos coloridos extraídos da biomassa de leveduras usadas precipitam junto com a goma xantana, produzindo um polímero de características especiais, de baixo custo visto que a biomassa residual utilizada é de baixo valor comercial.

EXEMPLO 5

Como referência demonstrativa e não restritiva, a viscosidade aparente máxima das gomas obtidas, dependendo das cepas de *Xanthomonas* utilizadas, da composição do meio e das condições de fermentação, variou de 4,12 a 45,34 mPa.s, para o biopolímero obtido a partir da biomassa de levedura de cerveja ou de álcool; e de 9,20 a 67,68 mPa.s quando obtido pela bioconversão da sacarose pura, ambas numa concentração de 0,5% de goma, taxa de cisalhamento de 25s^{-1} a 25°C .

REIVINDICAÇÕES

1. **“USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO,**
5 **SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO**
GOMA XANTANA”, utilizando as bactérias *Xanthomonas*, CARACTERIZADO pelo aproveitamento da biomassa de levedura de cerveja, de vinho, de álcool, etc. oriundos da produção de cervejas, de vinhos, de álcool, ou de outras fontes, como fontes de carbono e de outros nutrientes em processos fermentativos, sendo extremamente
10 favorável.

2. **“USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO,**
SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO
GOMA XANTANA”, utilizando a bactéria *Xanthomonas*, CARACTERIZADO pelo aproveitamento da biomassa industrial, levedura de cerveja ou de álcool, pura ou
15 impura, na suas diversas formas físicas (em pó, sólida, líquida ou outras formas), da produção de cerveja ou álcool, bem como de outra fonte, como fonte de carbono no substrato em processos fermentativos, sendo extremamente favorável.

3. **“USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO,**
SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO
20 **GOMA XANTANA”** de acordo com a reivindicação 1 e 2, CARACTERIZADO pela aplicação de diferentes valores para as variáveis físicas do processo fermentativo, tais como: concentração das leveduras (0,5 a 10%), temperatura de 25 a 32°C, pH de 3 a 11, rotação de 60 a 1000 rpm e tempo de fermentação de 2 a 6 dias.

4. **“USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO,**
25 **SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO**

GOMA XANTANA”, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **CARACTERIZADO** pela suplementação ou não de nutrientes como fonte de nitrogênio, fósforo e potássio no meio fermentativo, ou de natureza diversa e em concentrações variadas determinadas para cada cepa de *Xanthomonas* utilizada.

5 5. **“USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO, SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO GOMA XANTANA**”, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 e 4, **CARACTERIZADO** pelo uso de bioreatores e ou fermentadores contínuos ou em batelada, aerados e agitados mecanicamente.

10 6. **“USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO, SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO GOMA XANTANA**” de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4 e 5, **CARACTERIZADO** pelas etapas de pasteurização e/ou esterilização; pela purificação da goma produzida com ou sem centrifugação; da precipitação com solventes orgânicos;
15 separação por filtração; secagem por estufa, liofilização ou atomizador tipo spray drier; e moagem para obtenção da goma xantana em pó.

20

25

RESUMO

A presente patente de invenção refere-se ao “USO DA BIOMASSA DE LEVEDURA COMO SUBSTRATO, SUPLEMENTADO OU NÃO, PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO TIPO GOMA XANTANA” utilizando biomassa de levedura proveniente dos processos industriais fermentativos, ricas em carboidratos complexos e/ou simples, além de outros nutrientes, na forma de sólidos, pastas, líquidos, ou outras formas, ou o conjunto desses resíduos suplementados ou não com outros nutrientes, com cepas de *Xanthomonas* para a produção de bipolímeros tipo goma xantana, utilizando reatores aerados e agitados. A invenção visa obter substratos alternativos de baixo custo para o processo fermentativo para a produção de polissacarídeo tipo goma xantana, quando comparado ao processo industrial de bioconversão de sacarose ou glicose. Esta invenção envolve a otimização dos parâmetros de composição do meio de cultivo com biomassa de leveduras e das condições de fermentação tais como pH, temperatura, tempo e velocidade de agitação, e a avaliação da necessidade de fonte adicional de nitrogênio, fósforo, potássio, ou outros nutrientes, no substrato fermentativo.