



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

(21) **PI0902629-0 A2**

(22) Data de Depósito: 24/07/2009
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 19/06
C12R 1/64

(54) Título: **UTILIZAÇÃO DE ALGAROBA PARA A PRODUÇÃO DE POLÍMERO POLISSACARÍDEO BASE ÁGUA DO TIPO GOMA XANTANA**

(73) Titular(es): Quantas Biotecnologia S.A., Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, Departamento Regional da Bahia-Senai/DR/BA

(72) Inventor(es): Alessander Acacio Ferro, Edson Quirino Buzanelli, José Fernando Barreto da Silva, Luca Pessoa Buzanelli, Lúcio José Sobral Rocha, Marino Tadeu Fabi

(57) Resumo: UTILIZAÇÃO DE ALGAROBA PARA A PRODUÇÃO DE POLÍMERO POLISSACARÍDEO BASE ÁGUA DO TIPO GOMA XANTANA A presente invenção descreve um método prático para a utilização de algaroba para a produção de biopolímero aquoso-solúvel do tipo goma xantana, substituindo seja o meio de produção, seja o meio de crescimento, seja ambos os meios, usados no estado da arte de produção de GOMA XANTANA e conduzindo a processo com significativo ganho econômico em relação aos processos habituais de produção de goma xantana é apresentada.



UTILIZAÇÃO DE ALGAROBA PARA A PRODUÇÃO DE POLÍMERO POLISSACARÍDEO BASE ÁGUA DO TIPO GOMA XANTANA

A presente invenção refere-se ao uso do vegetal Algaroba (*Prosopis juliflora*) como matéria prima para processo industrial de produção de polissacarídeo, base água, do tipo goma xantana.

Goma xantana é produzida por ação de bactérias da espécie *Xanthomonas campestris* ou outras espécies de *Xanthomonas* em processo de fermentação aeróbica a partir de uma fonte de carbono. O Biopolímero Goma Xantana é utilizável em inúmeros ramos da indústria quais sejam alimentícia, cosmética, farmacêutica, têxtil, de explosivos e de petróleo exibindo excelentes características como viscosificante e apresentando efeito significativo como estabilizante em emulsões bem como uma excelente resistência salina e grande resistência a alterações de pH assim como estabilidade à ação enzimática o que torna crescente o uso de Goma Xantana como um aditivo importante em considerável pluralidade de processos e produtos.

Esse biopolímero tem massa molecular na faixa de 0,5 a 12 milhões de daltons e consiste molecularmente de uma cadeia de carboidratos em que glucose, manose e ácido glucurônico na proporção de 2:2:1 estão arranjados em uma cadeia principal constituída por ligações D-glucose-D-glucose (1-4) e em que a cada três unidades de glucose existe uma cadeia ramificada constituída por três carboidratos sendo aquele ligado à cadeia glucosídica, uma manose acetilada, o carboidrato central, sendo um ácido glucurônico e o terceiro carboidrato, uma manose contendo ligação acetal-1,3 com ácido pirúvico.

Numerosas publicações se referem à produção de polissacarídeos, base água, do tipo goma xantana, podendo ser citadas as patentes americanas: US 3.020.206, US 3.251.749, US 3.391.060, US 3.271.267, US 3.427.226, US 3.433.708, US 3.455.786, US 3.594.280, US 4.154.654 e US 4.282.321.

Goma Xantana é produzida por fermentação de fonte de carbono à base de carboidratos geralmente, glucose, sacarose, amido e outros em um meio de cultura adequado onde nitrogênio mineral na forma de cátions amônio ou nitrogênio orgânico bem como sais de potássio, magnésio, e outros íons em

menor concentração, dão condições a que o processo fermentativo transcorra seguindo uma cinética conhecida.

O procedimento usual para a realização da fermentação envolve dois passos diferenciados. Inicialmente, o microorganismo a ser utilizado é submetido a um cultivo adequado em pequena escala de forma a obter-se uma concentração de bactérias relativamente elevada correspondente a essa fase denominada de germinação ou de crescimento. Nessa fase, a bactéria não produz o exopolímero ou o produz em muito baixa concentração. A população dos microorganismos cresce significativamente nessa fase.

Por isso ela é denominada de fase de germinação ou de crescimento.

A partir daí, o material resultante dessa primeira etapa, tendo uma concentração relativamente elevada, é inoculado no reator de fermentação onde, em meio de fermentação, dito de produção, o desenvolvimento do biopolímero é consolidado.

As matérias primas para a obtenção de goma xantana são normalmente carboidratos quais sejam glucose, dextrose e sacarose. Pelo fato de sacarose e glucose serem alimentos humanos há interesse em usar uma fonte de carboidratos alternativa e cujo uso não influa na balança de alimentos.

Uma fonte de carboidratos atrativa que pode ser aproveitada para produção desse biopolímero, é o extrato de vagens da planta algarobeira (*Prosopis juliflora*).

A algarobeira é uma leguminosa de ampla difusão, resistente a estiagens prolongadas e disseminada sendo originária da América Central e do Sul e mesmo da Índia, e que cresce bem em climas áridos atuando como planta de reflorestamento e forragens sendo uma xerófita que se desenvolve muito bem no nordeste brasileiro e de forma mesmo descontrolada e agressiva sendo mesmo competitiva com a flora nativa.

A algarobeira é excelente para a alimentação do gado com suas folhagens e suas vagens e constituindo também fonte de excelente madeira. A resistência desse vegetal aos climas de deserto é devida à sua capacidade de absorção da umidade do ar que é por ela fixada por condensação e armazenada até suas raízes que são bastante longas.

A algarobeira é utilizada para a produção de madeira, carvão vegetal, estacas, álcool, melão, cachaça, alimentação animal e humana, apicultura, reflorestamento, ajardinamento e sombreamento, tornando-se, por conseguinte, uma cultura de importância econômico-social. No Nordeste brasileiro, esta xerófita, introduzida no início da década de 40, com o objetivo de alimentar animais e de ser utilizada em reflorestamento, aparece atualmente como uma possível fonte de biopolímeros para constituírem-se em insumos valiosos.

A produtividade média da árvore de Algaroba é de 3000kg por hectare, sendo superior por exemplo à do milho que é de 2000kg por hectare.

O farelo de algaroba que se constitui num produto industrial, é obtido pela moagem da vagem de algaroba uma vez seca e contém por volta de 55% de sacarose e é utilizado especialmente em rações animais. O farelo de algaroba contém finos e fibras onde celulose e hemiceluloses são os principais componentes.

O teor de carboidratos da vagem de algarobeira é muito elevado, da ordem de 75% em hidratos de carbono. Os açúcares são especialmente sacarose, e glucose. Também em sua composição, a parte protéica é importante correspondendo a 10 %. Dessa forma a algaroba é fonte muito rica de carboidratos que podem ser transformados adequadamente em biopolímeros do tipo goma xantana.

Na constituição global da vagem de algaroba, e, portanto, de seu farelo, os teores de potássio, magnésio, enxofre, ferro e outros micronutrientes existente é muito semelhante à concentração destas espécies catiônicas num meio de produção normalmente utilizado para o desenvolvimento do biopolímero goma xantana.

Assim, sendo a algaroba e especialmente o farelo de algaroba uma fonte de carboidratos com alta concentração destes e, portanto, uma fonte de carbono privilegiada e havendo em sua própria constituição micronutrientes nitrogenados e também cátions e ânions que são de mesma natureza dos meios de cultura normalmente utilizados para o crescimento e para a produção de biopolímeros aquoso-solúveis especialmente goma xantana por

fermentação bacteriana adequada, a idéia é o uso da algaroba e seu farelo diretamente na produção de goma xantana.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se ao uso do vegetal Algaroba (*Prosopis juliflora*) como matéria prima para processo industrial de produção de polissacarídeo, base água, do tipo goma xantana.

Mais especificamente, a presente invenção se refere ao aproveitamento do farelo da vagem do vegetal Algaroba (*Prosopis juliflora*) de forma a obter-se o biopolímero aquoso-solúvel do tipo goma xantana.

10 Nesse aspecto é então o uso de extrato de Algaroba como fonte de carbono e como meio de desenvolvimento na fase de produção para a obtenção de polissacarídeo aquoso-solúvel do tipo goma xantana.

Não existe menção no estado da arte ao uso de extrato de Algaroba como fonte para a produção de goma xantana ou similares tirando partido do
15 alto teor de carboidratos e da composição de micro nutrientes presentes nesse material conduzindo à produção do biopolímero goma xantana com ganhos econômicos significativos em relação ao estado da arte da produção desse biopolímero.

Algaroba é o vegetal *Prosopis juliflora*, uma leguminosa de enorme
20 resistência a solos áridos que caracterizam o semi-árido e a caatinga e que cresce com grande vigor no Nordeste brasileiro.

Utilização do farelo de algaroba para obtenção do biopolímero aquoso-solúvel do tipo goma xantana.

A utilização do farelo de algaroba como fonte direta de obtenção de um
25 extrato aquoso rico em sacarose e que seja utilizado diretamente como fonte de carbono e como meio de cultura para a produção de biopolímero do tipo goma xantana é uma alternativa inovadora já que permite ganhos consideráveis comparativamente ao processo do estado da arte de obtenção desse biopolímero já que com esse material, a fonte de carbono e o meio de
30 desenvolvimento e produção rico em cátions e anions necessário para a bactéria responsável pela produção do exopolímero estão já contido nesse respectivo extrato.

Assim, a fermentação desse extrato aquoso obtido do farelo de algaroba com microorganismos do tipo *Xanthomonas campestris* ou outras espécies de *Xanthomonas* ou ainda outros microorganismos gera o biopolímero do tipo goma xantana correspondente ou outros biopolímeros respectivos.

5 Caracterização

A metodologia de obtenção desse extrato aquoso e sua purificação previamente á sua introdução no reator de fermentação para ser inoculado com o meio de crescimento contendo as bactérias já em fase adequada de desenvolvimento ou para ser inoculado com as bactérias de forma que elas cresçam nesse meio orgânico, naturalmente rico em micronutrientes e espécies catiônicas e aniônicas e de forma a que, nesse próprio meio, produzam o exopolímero do tipo goma xantana, constituem elementos importantes dessa inovação.

A composição da vagem da algarobeira, segundo a Patente de Invenção PI8601641 está indicada a seguir:

Componentes		Porcentagem (% peso)
Vagem	Epicarpo (casca)	44
	Mesocarpo (polpa)	30
	Endocarpo (caroço)	15
	Semente	11
	Total	100
Semente	Casca	26
	Endosperma	27
	Embrião	47
	Total	100

De forma geral, tomando em conta ainda outras informações, na vagem da algaroba, a semente está presente a 10-13% e da semente, 25-30% constituem o endosperma.

A polpa da vagem da algaroba, composta pelo exocarpo e mesocarpo, responde por 56% do peso seco da vagem de algaroba. Na composição química da polpa, encontra-se a sacarose em 46,3% do peso. Nas sementes, que perfazem cerca de 9%-11% do peso seco da vagem, encontram-se o episperma (20%), o endosperma (32%) e os cotilédones (48%).

No endosperma, o polissacarídeo predominante é a galactomanana, composta basicamente por 46,28% de manose e 33,97% de galactose e que essa patente destaca.

A composição das vagens é conforme indicado a seguir sem considerar o teor de sacarose já indicado acima.

QUADRO 1. Composição das vagens e folhas da algarobeira em diversos princípios nutritivos (g/kg MS).

Componentes	Vagens	Folhas
Matéria Seca (g/kg)	866,0	408,2
Matéria Orgânica	964,1	839,5
Extrato Etéreo	18,5	53,5
Proteína Bruta (N x 6,25)	100,0	157,7
Nitrogênio Total	16,0	25,2
Nitrogênio Protéico	9,2	18,6
Nitrogênio não Protéico	6,8	6,6
Fibra Bruta	167,8	209,4
Fibra Neutro Detergente	296,0	310,5
Fibra Ácido Detergente	193,2	217,5
Celulose	154,6	131,3
Lignina	38,6	86,2
Açúcares Redutores	457,0	46,6
Extrato não Nitrogenado	677,8	409,9
Energia Bruta (Kcal/kg MS)	4.558	4.346

Dessa forma, o crescimento das células de *Xanthomonas campestris* é realizado em meio de extrato de algaroba com uma cinética de crescimento adequada a esse meio.

5 Utilização do farelo de algaroba para obtenção do biopolímero aquoso-solúvel do tipo goma xantana.

Por esse módulo a matéria prima é o farelo de algaroba do tipo daquele fornecido por empresas especializadas. Este farelo é extraído com água e o extrato aquoso é utilizado diretamente na produção do biopolímero aquoso-solúvel do tipo goma xantana.

10 A composição de um extrato desse farelo é rica em carboidratos a teores superiores a 50%, em proteínas a 25% , glucídios a 5%, bem como os elementos e microelementos em que se destacam potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês e fosfato.

O processo

15 Duas formas de utilização são protegidas por essa patente: a utilização do extrato aquoso como meio de produção e a utilização do extrato aquoso encadeadamente como meio de crescimento e meio de produção no mesmo reator.

20 O farelo de algaroba é recebida dos centros de plantação e produção e estocada adequadamente com cuidados quanto à sua manutenção e protegida quanto à sua conservação física e ao desenvolvimento de organismos e microorganismos que possam danificá-la ou comprometê-la.

25 Aproximadamente 150g de farelo de algaroba são peneirados em peneira de 60 mesh separando-se o material constituído principalmente de fibras que não é utilizado.

68 gramas de farelo de algaroba já peneirado são suspensos em um litro de água e batidos em liquidificador de forma a que praticamente 90 % do material se dispersa de forma homogênea.

30 A suspensão é filtrada em filtro de 350 mesh e o material obtido é utilizado de duas formas diferentes.

Esse extrato aquoso apresenta um teor da ordem de 56% de sacarose conforme quantificado por HPLC.

Deve ser destacado que esse processo se refere à obtenção e utilização do extrato aquoso do conteúdo da vagem no caso na forma de farelo dessa vagem o que não se restringe a essa mesma forma, podendo ser uma alternativa comprimir-se a vagem em água sem tê-la secado previamente obtendo-se da mesma forma um extrato do material que seguirá processo análogo ao descrito a seguir.

Utilização da solução aquosa resultante da extração do farelo de algaroba como meio de produção do biopolímero goma xantana

500ml da solução obtida segundo o item anterior foram esterilizados a 125°C e a ele foram adicionados 100ml de uma solução do meio de crescimento YM em que se tenha desenvolvido por 55 horas, conforme o estado da arte, os microorganismos *Xanthomonas campestris*.

O meio de cultura YM é composto, como sabido, por fermento, malte e fonte de nitrogênio no caso peptona. A referência apresenta a preparação desse meio de cultura. Tal meio de cultura, após esterilização a 125°C fora inoculado com o equivalente a 1ml de solução desenvolvida previamente e congelada em Ependorf, de *Xanthomonas campestris*. Não há restrição alguma quanto à cepa de *Xanthomonas campestris* a ser utilizada. Após 55 horas de crescimento em que a cinética desse crescimento bacteriano atinge sua fase lag, essa solução de meio de cultura contendo os microorganismos suficientemente crescidos é adicionada conforme indicado, a 500ml do meio constituído pelo extrato aquoso de farelo de algaroba .

O desenvolvido do biopolímero é prosseguido sob agitação orbital em shaker e a 27 °C. Após 72 horas, em que o meio atinge viscosidade e aspecto indicadores da presença do biopolímero em concentração adequada, o meio é tratado com isopropanol e a goma xantana é precipitada e, após lavagem, é secada e caracterizada adequadamente por técnicas químicas, cromatográficas e espectroscópicas.

Utilização da solução aquosa resultante da extração do farelo de algaroba como meio de crescimento do microorganismo *Xanthomonas campestris* e meio de produção do biopolímero goma xantana.

500ml da solução obtida segundo o item anterior, foram esterilizados a 125°C e a ele são adicionados o equivalente a um Ependorf correspondente a 1ml de solução de meio de cultura com células de *Xanthomonas campestris*, conservado até então congelado, conforme descrito no estado d'arte da produção do biopolímero goma xantana.

Colocado em shaker com agitação orbital de 350rpm, o crescimento bacteriano foi acompanhado até que os microorganismos atingissem a fase lag nesse meio de crescimento.

Ainda no mesmo erlemeyer, o sistema é deixado por tempo adequado a que a fermentação levando à produção do exopolímero, se estabeleça e se consolide. Tempos totais de crescimento e de produção com o mesmo meio de desenvolvimento são, via de regra, menores que os obtidos com os meios de cultura habituais do estado da arte da produção de goma xantana. Em 75 horas em média, desde a inoculação do Ependorf contendo a solução congelada de células, obtém-se o processo completo com crescimento e produção.

Assim, o extrato do farelo da vagem de algaroba, por essa forma de utilização dispensa o uso de matéria prima açúcar propriamente dito e dispensa os insumos que correspondem aos meios de crescimento e produção habituais de goma xantana.

Dessa forma, o extrato em consideração é o meio de cultura para a fermentação com microorganismos do tipo *Xanthomonas campestris* resultando na goma xantana produzida integralmente a partir do extrato de algaroba substituindo as fontes habituais de carboidratos mono e dissacarídeos sacarose, glucose ou dextrose normalmente utilizados e dispensando também os componentes do meio de cultura normalmente utilizados para a produção desse biopolímero.

Tal se justifica por que o extrato aquoso da vagem de algaroba já contém, não só um teor adequado e elevado de carboidratos, bem como de substâncias de caráter protéico e também teores de micronutrientes minerais que permitem uma simplificação considerável no processo fermentativo, dispensando os meios habituais de crescimento e de produção de Goma

Xantana, sendo todo o procedimento fermentativo realizado em meio de extrato de algaroba.

Assim, o meio de produção que é caracterizado por açúcares ao lado de heteroelementos catiônicos quais sejam potássio, magnésio, cálcio, ferro, zinco e aniônicos como fosfatos, nitratos e sulfatos, citratos e boratos, é completamente substituída nessa invenção, por extrato de algaroba (de preferência extrato de farelo de algaroba).

Ficará claro aos versados na técnica que variações no meio de cultivo podem ser feitas, sem com isso fugir do conceito inventivo e escopo da invenção. Assim, pretende-se que a presente invenção cubra tais modificações e variações, contanto que elas se encontrem no escopo das reivindicações apenas e seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1) Processo industrial para produção de polissacarídeo, base água do tipo goma xantana **caracterizado** por substituição da fonte de carbono, normalmente açúcares glucose, sacarose, dextrose é pelo substrato vegetal obtido a partir de vagens de algaroba sendo este utilizado na fermentação sob ação do microorganismo *Xanthomas campestris* de cepa previamente definida ou outro microorganismo alternativo habitualmente utilizado para obtenção de Goma Xantana.

2) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo uso de substrato vegetal obtido a partir de vagens de algaroba em substituição aos meios de cultura de produção habituais do tipo SD e utilizando o microorganismo *Xanthomas campestris* de cepa previamente definida ou outro microorganismo alternativo para obtenção de Goma Xantana.

3) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo uso de substrato vegetal obtido a partir de vagens de algaroba em substituição aos meios de cultura de crescimento e de produção habituais do tipo YM e SD e utilizando o microorganismo *Xanthomas campestris* de cepa previamente definida ou outro microorganismo alternativo para obtenção de Goma Xantana

4) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo uso de substrato vegetal obtido a partir de farelo de algaroba em substituição aos meios de cultura de produção habituais do tipo SD e utilizando o microorganismo *Xanthomas campestris* de cepa previamente definida ou outro microorganismo alternativo para obtenção de Goma Xantana.

5) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo uso de substrato vegetal obtido a partir de farelo de algaroba em substituição aos meios de cultura de crescimento e de produção habituais do tipo YM e SD e utilizando o microorganismo *Xanthomas campestris* de cepa previamente definida ou outro microorganismo alternativo para obtenção de Goma Xantana.

6) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo uso de substrato vegetal constituído de modo a que haja um aproveitamento racionalizável de um vegetal que hoje é caracterizado como uma praga pelos ecologistas e especialistas da biodiversidade da região Nordeste catalisando a

implantação de sistemas de plantações organizadas desse vegetal e seu aproveitamento.

5 7) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo uso de substrato vegetal constituído de forma a que o meio de produção do biopolímero goma xantana é o extrato aquoso obtido a partir do farelo de algaroba em que os açúcares constituintes deste extrato substituem a fonte de carbono carbohidrato normalmente utilizada nesse tipo de fermentação.

10 8) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo uso de substrato vegetal constituído de forma a que o meio de produção do biopolímero goma xantana é o extrato aquoso obtido a partir do farelo de algaroba em que os micronutrientes, aminoácidos, cátions e ânions constituintes deste extrato substituem o meio de produção normalmente utilizado nessa fermentação que se constitui de sais de potássio, magnésio, cálcio, amônio e fosfatos.

15 9) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo uso de substrato vegetal constituído em que o meio de produção e o meio de crescimento das células de *Xanthomonas campestris* para a produção do biopolímero goma xantana é o extrato aquoso purificado obtido a partir do farelo de algaroba e em que o tempo de desenvolvimento do biopolímero é
20 mais curto que o tempo normalmente necessário para o processo no estado da arte da produção de goma xantana.

P-0902629-0

RESUMO**UTILIZAÇÃO DE ALGAROBA PARA A PRODUÇÃO DE POLÍMERO
POLISSACARÍDEO BASE ÁGUA DO TIPO GOMA XANTANA**

- 5 A presente invenção descreve um método prático para a utilização de algaroba para a produção de biopolímero aquoso-solúvel do tipo goma xantana, substituindo seja o meio de produção, seja o meio de crescimento, seja ambos os meios, usados no estado da arte de produção de GOMA XANTANA e conduzindo a processo com significativo ganho econômico em
- 10 relação aos processos habituais de produção de goma xantana é apresentada.