



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

(11) (21) **PI 0302205-6 A**



(22) Data de Depósito: 26/05/2003  
(43) Data de Publicação: 22/03/2005  
(RPI 1785)

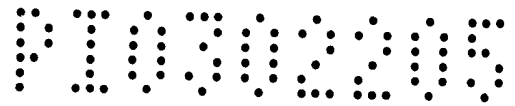
(51) Int. Cl<sup>7</sup>.:  
C12P 19/06  
C12R 1/64

(54) Título: **MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**

(71) Depositante(s): Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (BR/SP)

(72) Inventor(es): Pedro de Oliva Neto, Luisa Helena dos Santos

(57) Resumo: "MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA". O qual se refere a um processo biológico de produção da goma xantana através da propagação celular das bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e/ou *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e/ou *Xanthomonas* spp, em cultivos biotecnológicos em condições específicas, bem como etapas de separação e purificação da molécula, sendo que, nessa invenção é utilizado para comprovar a otimização do processo de produção da xantana, parâmetros específicos quantitativo, tais como o rendimento do produto (goma xantana produzida pelo açúcar consumido), aqui simbolizado Yp/s; e qualitativo, onde é utilizada a viscosidade da goma (medida em solução aquosa a 3% (em cP a 25°C. e 6 rpm), já que essa é a principal propriedade desejável na aplicação industrial desse produto.



## MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA.

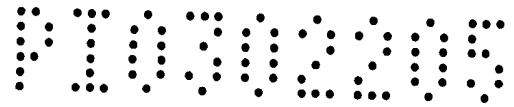
### Campo de aplicação:

A presente invenção se refere a um processo biológico de produção da goma xantana através da propagação celular das bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e/ou *Xanthomonas campestris* pv *campestris* e/ou *Xanthomonas* spp, em cultivos biotecnológicos em condições específicas, bem como etapas de separação e purificação do molécula.

### Estado da técnica:

Fica desde já caracterizada a molécula da goma xantana como um hétero-polímero com uma cadeia principal idêntica a da celulose composta de unidades de D-glicose unidas por ligações Beta (1→4) e cadeias laterais com resíduos alternados de D-manose e ácido D-glicurônico na proporção 2:1, tendo em aproximadamente metade das unidades D manose terminais um resíduo de ácido pirúvico ligado nas posições 4 e 6. Tal produto é um hidrocolóide com capacidade de formar géis em solução aquosa, mesmo em baixas concentrações.

A xantana tem aplicação como agente espessante, estabilizante, gelificante e emulsificante, e vêm substituindo progressivamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais como plantas e animais. As aplicações dos biopolímeros e, em especial, da xantana são: na formulação de alimentos, indústrias de petróleo, de mineração, têxtil e termoquímica, de tintas de impressão, de papel, cosmética, farmacêutica, e de produtos agropecuários, onde além de serem utilizados como formadores de gel, espessantes e agentes de



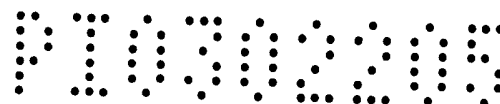
suspensão, são utilizados também por suas propriedades flocculantes, adesivas, formadoras de filmes, lubrificantes e redutoras de fricção.

Nessa invenção é utilizado para comprovar a otimização do processo de produção da xantana, parâmetros específicos quantitativo, tais como o rendimento do produto (goma xantana produzida pelo açúcar consumido), aqui simbolizado  $Y_p/s$ ; e qualitativo, onde é utilizada a viscosidade da goma (medida em solução aquosa a 3% (em cP a 25°C. e 6 rpm), já que essa é a principal propriedade desejável na aplicação industrial desse produto.

#### **Objetivos da invenção:**

A presente invenção combina diferentes níveis de pH, temperaturas, nutrientes e processos fermentativos, em duas distintas fases de cultivo da bactéria, a primeira, onde o objetivo é a produção de células viáveis, que servirá de inóculo e, a segunda, onde será feita a produção da xantana de forma otimizada. A presente invenção também descreve os métodos possíveis de concentração, separação, secagem e moagem do biopolímero.

Atualmente, a patente brasileira PI 8805325 descreve apenas informações vagas de parâmetros críticos ao processo fermentativo de produção da xantana tais como uma faixa de temperatura de 25-30°C. tanto para a fase de crescimento como para a produção de goma. Não menciona o pH ideal da fase de crescimento o qual impacta de forma significativa na fase seguinte, da produção de xantana. Para a fase de produção de xantana essa patente (PI 8805325) utilizando microrganismos diferentes dos propostos na invenção aqui proposta, propõe a faixa de pH entre



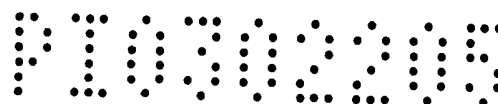
6,5-7,5. Essa faixa é bem mais restrita considerando-se o objetivo da produção otimizada dessa molécula, visando a viabilidade técnica e econômica do produto, sinalizada pelo rendimento e qualidade da goma, o que será apresentado na presente invenção.

5 O detalhamento da concentração de sacarose ideal para a produção da xantana é outro parâmetro fundamental. A patente PI 8805325 A propõe para aqueles microrganismos definidos como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e outros variantes, a concentração de sacarose até 20% para a produção de goma, e até  
10 10% para a produção de biomassa, valores muito elevados para um cultivo otimizado.

A separação da goma xantana pela patente PI 8805325 se dá apenas pela precipitação em etanol ou isopropanol diretamente, numa concentração final de 50-80% seguida de  
15 centrifugação. A presente invenção propõe o uso da tecnologia da filtração da xantana posteriormente à precipitação da mesma, o que leva a uma economia expressiva em relação à manutenção e aquisição de centrífuga.

Também no processo ora proposto são definidas  
20 alternativas mais econômicas através da concentração do caldo de fermentação, como etapa anterior à precipitação por solventes, e a secagem por "spray-drier", ou atomizador, ou em esteiras com fluxo de ar quente, alternativamente ao método de secador de superfície raspada citado pela patente PI 8805325.

25 Outro aspecto importante é a formulação do meio de produção da goma xantana, que, na tecnologia proposta pela PI 8805325 utiliza como fontes nitrogenadas compostos de farelo de soja, uréias ou nitratos numa faixa de 0,01-1%. Na patente aqui

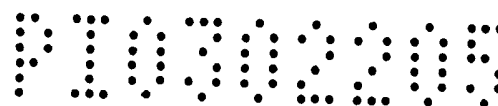


proposta utiliza-se sais de amônia ou amônia líquida em condições específicas, com os atrativos de preços economicamente viáveis e disponibilidade, já que tais agentes são usados amplamente em outros processos fermentativos e, na invenção aqui proposta, os  
5 testes se mostraram viáveis. Será destacada também a utilização de outros nutrientes importantes no meio proposto contendo zinco, boro, ferro e cálcio não descritos na patente PI 8805325.

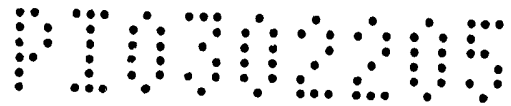
Desta maneira, para melhor esclarecer a invenção acima proposta, é apresentada em seguida uma descrição  
10 detalhada da mesma, sendo relacionadas as etapas propostas nessa tecnologia de produção de xantana:

a) - A preservação das linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e/ou *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e/ou *Xanthomonas* spp que pode ser feita por métodos de conservação  
15 temporários (armazenamento sob temperatura ambiente ou refrigeração) ou métodos de conservação duradouros, por congelamento direto das células sob glicerol 10% estéril ou no meio Yeast Malt com adição de glicerol a 10%, sob temperatura de 0 a – 200°C., preferencialmente –70 a –200°C, ou pelo processo de  
20 liofilização. Ambos podem preservar as linhagens por muitos anos. A não utilização de um método de preservação prolongado das linhagens pode ocasionar a alteração, contaminação e perda do material genético.

b) - A propagação celular das células deve ser realizada  
25 transferindo-se assepticamente as linhagens preservadas para meio de cultivo contendo como fonte de carbono e energia o melaço de cana 0,1 – 3%, preferencialmente 2%, ou, alternativamente glicose ou sacarose a 0,1-3%, preferencialmente 1%; como fonte de



- vitaminas e nitrogênio, deve-se usar o extrato de levedura 0,1-2%, preferencialmente 0,5-1% e/ou a formulação nitrogenada peptona 0,1-2,0%, preferencialmente 0,5%, extrato de malte 0,1-2%, preferencialmente 0,3-0,5%. Ainda como fonte nitrogenada para o
- 5 crescimento celular pode-se utilizar a uréia 0,1-2,0 g/l, preferencialmente 1,0 g/l e/ou o sulfato de amônia 0,1-2 g/l, preferencialmente 1,0 g/l. A adição de agar-agar 1-2,5% é opcional para o caso do meio ser sólido.
- c) - O pH final do meio de crescimento ou propagação celular deve
- 10 ser ajustado para uma faixa de pH 5,5-7,5, preferencialmente pH=6,0, e a temperatura de cultivo nessa fase de propagação celular deve ser de 24-29°C., preferencialmente 27°C., para obtenção de rendimentos celular e de produção de xantana, economicamente viáveis.
- 15 d) - Enquanto utilizando-se a temperatura de 27°C. na fase de propagação celular produz-se cerca de 20-30 g/l de xantana,  $Y_{p/s}$  0,35-0,50, e viscosidade entre 27000 a 33000 cP com temperaturas inferiores (24°C. ) ou superiores (29°C.) resulta numa concentração de xantana cerca de três a cinco vezes inferior,  $Y_{p/s}$  duas a três
- 20 vezes inferior e viscosidade duas a cinco vezes inferior.
- e) - Enquanto utilizando-se pH= 6,0 na fase de propagação celular obtém-se 20-30 g/l de xantana ou  $Y_{p/s}$  0,35-0,50, e viscosidade entre 27000 a 33000 cP. Utilizando-se pH 7,0 ou 7,5 resulta numa concentração de xantana cerca de três a oito vezes inferior,  $Y_{p/s}$
- 25 três a quatro vezes e meia inferiores e viscosidade três a doze vezes inferior.
- f) - A propagação celular é feita através do método de subcultivos assépticos ou não, preferencialmente assépticos, utilizando-se

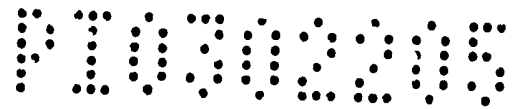


como inóculo para a etapa posterior um volume de 5-15% do cultivo da etapa anterior, preferencialmente 8-10%. Por exemplo, repicando-se 0,1 ml da cultura preservada em 8-10ml, tal volume servirá como inóculo para um cultivo contendo um volume de 64-  
5 100 ml do meio descrito anteriormente. A forma de alimentação do meio de cultivo pode ser feita pelos processos: "Batch", definido aqui como Batelada simples ou coloca-se todo o meio de cultivo de uma só vez no fermentador e retira-se o caldo fermentado no final do processo; "Fed-Batch", traduzido como Batelada Alimentada e  
10 definido aqui como o processo de alimentação ou enchimento do meio de cultivo de forma gradual respeitando o tempo de enchimento do processo, e a retirada do caldo fermentado é feita de uma só vez no final; ou "Contínuo", processo onde a alimentação do meio de cultivo e a retirada do caldo fermentado são feitos  
15 simultaneamente e na mesma vazão. Nessa invenção recomenda-se, preferencialmente, "Batch ou "Fed-Batch" para evitar contaminações e dar maior agilidade nessa etapa.

g) - O tempo de cultivo para cada etapa da fase de propagação celular dependerá do processo utilizado variando de 5 a 48 horas,  
20 preferencialmente 12-24 h. no processo Batch. A alimentação otimizada do caldo no processo "Fed Batch" ou Contínuo deverá ser realizada com o tempo de enchimento do fermentador, preferencialmente quando o teor de açúcar no meio de cultivo cair aproximadamente à metade. O término da fermentação nesses dois  
25 últimos processos se dará quando o teor de açúcares redutores totais atingir níveis inferiores a 1%, preferencialmente, inferiores a 0,2% em amostras onde a goma é previamente removida.

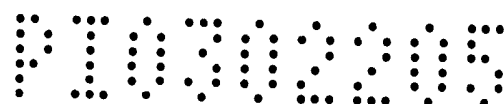
# Plano de Trabalho

- h) - Os equipamentos a serem utilizados no cultivo dependerão do volume em questão. Para pequenos volumes até 3 litros, podem ser utilizados agitadores orbitais, estufas bacteriológicas ou equipamento “banho-maria” com agitação orbital. Para volumes superiores, preferencialmente deve-se utilizar aparelhos do tipo fermentadores, consistindo de vasos de aço, vidro ou plástico resistente, com uma relação de diâmetro:comprimento que pode variar de 1:1 até 1:10, preferencialmente deve-se utilizar a faixa variável de proporções 1:1 à 1:2.
- 5
- i) - Tais equipamentos deverão conter controles automáticos ou manuais, preferencialmente automáticos, de temperatura, pH, alimentação de ar, numa faixa de 0,1 a 2 vvm (volume de ar por volume de tanque por minuto) preferencialmente 0,5-1 vvm., ou oxigênio, em volumes 10% inferiores, e agitadores mecânicos com defletores.
- 10
- 15
- j) - Terminada a fase de propagação celular tem-se o inóculo, suspensão de células no caldo fermentado, que serve para a fase seguinte, onde a produção de xantana se dá pela reação de conversão da glicose, sacarose ou outros açúcares catalisada pela bactéria inoculada no meio de cultivo. Nessa fase a produção de células deve ser minimizada para maximizar a produção da xantana.
- 20
- k) - A fase de produção industrial da xantana pode ser feita no mesmo fermentador através da alimentação do meio de produção de xantana, via processo “Batch”, “Fed-Batch” ou contínuo de alimentação, ou alternativamente, em outro fermentador próprio para tal finalidade, preferencialmente são mais recomendados os
- 25

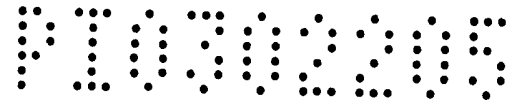


processos “Batch” ou “Fed-Batch”, devido aos menores riscos de contaminação do cultivo.

- l) - A temperatura do caldo em fermentação na fase de produção da xantana deve ser controlada manual ou automaticamente, via eletrônica, preferencialmente via eletrônica, para uma faixa de 29° C a 33°C. Visando a otimização do rendimento do produto deve-se operar preferencialmente à 30-31°C.
- m) - Enquanto que utilizando-se a temperatura de 30°C. no caldo na fase de produção de xantana obtém-se entre 20-30 g/l de xantana, Yp/s 0,35-0,50, e viscosidade entre 27000 a 33000 cP com temperaturas inferiores (29°C. ) ou superiores (33°C.) resulta numa concentração de xantana cerca de duas a vinte e três vezes inferior, Y p/s duas a dezoito vezes inferior e viscosidade cerca de duas a dezessete vezes inferior.
- n) - A faixa de pH do meio de cultivo deve ser de pH 6,0-7,5, preferencialmente pH 6,8-7,1 visando a otimização do processo na fase de produção do biopolímero. Como há uma tendência de diminuição do pH nas primeira horas dessa fase, em função de ácidos produzidos, recomenda-se a utilização de agentes alcalinos, tais como hidróxidos, ou amônia, preferencialmente hidróxido de sódio, alimentado no fermentador de forma manual ou automática, preferencialmente a forma automática, com dispositivos eletrônicos de dosagem e aferição do pH no fermentador. Após as primeiras 12-36 horas, inicia-se uma fase de reação alcalina necessitando a adição de ácidos clorídrico, sulfúrico ou outros, preferencialmente ácido clorídrico ou sulfúrico, preferencialmente, também, controlado de forma automática.



- o) - Enquanto que utilizando-se o pH=7,0 no caldo na fase de produção de xantana obtém-se entre 20-30 g/l de xantana, Yp/s 0,35-0,50, e viscosidade entre 27000 a 33000 cP com pH inferior (6,0) ou superior (7,5) resulta numa concentração de xantana cerca de duas vezes e meia a seis vezes inferior, Y p/s duas a três vezes e meia inferior e viscosidade cerca de duas a cinco vezes inferior.
- p) - O meio de cultivo a ser utilizado na fase de produção da xantana pelo processo "Batch" consiste de sacarose, glicose ou derivados hidrolisados, 1 a 5%, preferencialmente 4%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1-0,7%, preferencialmente 0,5%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01- 0,04%, preferencialmente 0,02%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1-0,4%, preferencialmente 0,2%, ácido cítrico 1-3%, preferencialmente 2%, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,002-0,0010 g/l, preferencialmente 0,006 g/l, ZnO 0,002 – 0,015 g/l, preferencialmente 0,006 g/l, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,0012-0,0036 g/l, preferencialmente 0,0024 g/l, CaCO<sub>3</sub> 0,01-0,05 g/l, preferencialmente 0,02g/l. Alternativamente à sacarose comercial, pode-se utilizar açúcar líquido, HTM (high titer molasses), ou melaço de cana, reduzindo os outros componentes acima mencionados em função da composição química desses produtos.
- q) - No processo "Batch" utilizando-se 4% de sacarose no caldo de produção de xantana, em 60 horas de reação obtém-se entre 20-30 g/l de xantana, Yp/s 0,35-0,50, e viscosidade entre 27000 a 33000 cP. Com concentrações iguais ou superiores a 6% de sacarose resulta numa concentração de xantana maior ou igual a 3,8 vezes inferior, Y p/s 3,3 vezes inferior ou mais, e viscosidade maior ou igual a 2,4 vezes inferior àquela obtida com 4% de sacarose.
- r) - Caso se utilize o processo "Fed-Batch" ou contínuo de alimentação do fermentador, a concentração de sacarose e os

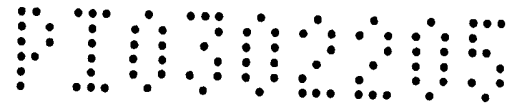


outros nutrientes do meio de produção da xantana, descritas acima, podem ser aumentadas de 2 a 10 vezes, conforme o tempo de enchimento do fermentador no processo Fed-Batch ou do açúcar residual no fermentador não superior à 5%, preferencialmente não superior à 4%, nos processos contínuo ou Fed-Batch.

s) - O tempo da fermentação na fase de produção do biopolímero pode variar de 48 a 120 horas, caracterizado pelo término da produção da xantana, que deve ser estimada através de amostragens, precipitação com etanol numa relação igual ou superior a 3:1 (etanol:amostra) e secagem da goma à 35-105°C.

t) - O caldo fermentado pode ser seco diretamente por atomizador ou "Spray drier" ou "Roll drier" ou em estufas de ar forçado, preferencialmente deve-se utilizar a técnica de "Spray drier" em temperaturas de entrada do sistema de tal forma que a temperatura de saída não torne o produto pegajoso, empelotado. O caldo fermentado pode ser separado das células previamente à secagem, através da centrifugação em centrífuga de boquilha ou deslocamento automático, com 6000 x g (força gravitacional). Tais procedimentos aqui serão descritos como método A de separação da xantana com ou sem células.

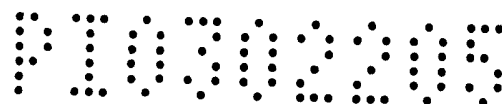
u) - O caldo fermentado pode ser Centrifugado conforme já exposto e, em seguida, concentrado em concentrador à vácuo ou não, podendo ser usados concentradores em forma de tanques (tachos), ou outros tipos disponíveis para produção de açúcar. Dependendo do interesse, após a concentração pode ou não ser seco, conforme descrito anteriormente. Tal método aqui será descrito como método B de separação da xantana, com eliminação de células, concentração do caldo e secagem da goma.



v) - O caldo fermentado pode ser centrifugado e concentrado conforme descrito anteriormente e, em seguida, submetido a uma precipitação com solventes orgânicos, etanol, éter ou álcool isoamílico, preferencialmente o etanol em concentração de 90-100  
5 GL, pela disponibilidade e preço, numa proporção de 2:1 à 5:1 (etanol:caldo fermentado) dependendo da concentração da goma no caldo. Após o contato com o solvente a goma precipita e se torna insolúvel, podendo ser centrifugada em centrífugas de cesto, boquilha ou de descarga intermitente, preferencialmente, centrífuga  
10 de cesto; ou a amostra pode ser filtrada, técnica preferencialmente mais recomendada, em filtros do tipo peneiras estáticas ou rotativas ou outros sistemas de filtração, com porosidade de 30-200 mesh, preferencialmente 60-200 mesh, ou a combinação de filtros seguindo um gradiente de porosidade. A secagem pelo método  
15 pode ser feita em estufas, ou esteiras rolantes e com fluxo de ar quente, preferencialmente a segunda opção. Tal método aqui será descrito como método C de separação da xantana, tratando-se assim do produto mais puro.

w) - Para maior purificação da goma, pode-se ainda ressuspender a  
20 xantana, obtida por qualquer um dos três métodos, em solução aquosa e precipita-la novamente com os solventes e proporções já descritos, eliminando assim, íons e outras moléculas residuais, purificando ainda mais a xantana. As etapas seguintes, separação e secagem, são feitas conforme já descrito no método C dessa  
25 invenção.

x) - No caso da xantana ser obtida de forma seca, está pode ser moída para atingir a granulação desejada em moinhos tipo faca e/ou martelo.

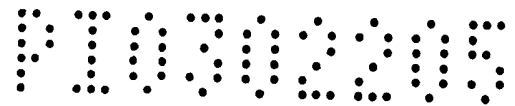


## REIVINDICAÇÕES

**1ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, o qual esta caracterizado por a primeira etapa de produção ser a preservação das linhagens de Xanthomonas axonopodis pv. manihotis e/ou Xanthomonas campestris pv campestris e/ou Xanthomonas spp que pode ser feita por métodos de conservação temporários (armazenamento sob temperatura ambiente ou refrigeração) ou métodos de conservação duradouros (por congelamento direto das células sob glicerol 10% estéril ou no meio Yeast Malt com adição de glicerol a 10%, sob temperatura de 0 a -200°C) ou pelo processo de liofilização, sendo que ambos podem preservar as linhagens por muitos anos, porém, a não utilização de um método de preservação prolongado das linhagens pode ocasionar a alteração, contaminação e perda do material genético.

**2ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme descrito na reivindicação 1, caracterizado por a propagação celular das células ser realizada transferindo-se assepticamente as linhagens preservadas para meio de cultivo contendo como fonte de carbono e energia o melaço de cana 0,1 – 3%, ou, alternativamente, glicose ou sacarose a 0,1-3%, como fonte de vitaminas e nitrogênio deve-se usar o extrato de levedura 0,1-2%, e/ou a formulação nitrogenada peptona 0,1-2,0%, extrato de malte 0,1-2% e, como fonte nitrogenada para o crescimento celular, pode-se utilizar a uréia 0,1-2,0 g/l, e/ou o sulfato de amônia 0,1-2 g/l, já a adição de agar-agar 1-2,5% é opcional para o caso do meio ser sólido.

**3ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE**

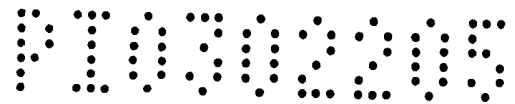


**PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 2, caracterizado por o pH final do meio de crescimento ou propagação celular ser ajustado para uma faixa de pH 5,5-7,5, e a temperatura de cultivo nessa fase de propagação celular ser de 24-29°C., para  
5 obtenção de rendimentos celular e de produção de xantana, economicamente viáveis.

**4ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de utilizando-se a temperatura de 27°C. na  
10 fase de propagação celular produz-se cerca de 20-30 g/l de xantana,  $Y_p/s$  0,35-0,50, e viscosidade entre 27000 a 33000 cP, sendo que, com temperaturas inferiores (24°C.) ou superiores (29°C.) resulta numa concentração de xantana cerca de três a cinco vezes inferior,  $Y_p/s$  duas a três vezes inferior e viscosidade  
15 duas a cinco vezes inferior.

**5ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de utilizando-se pH=6,0 na fase de propagação celular obtém-se 20-30 g/l de xantana ou  $Y_p/s$  0,35-  
20 0,50, e viscosidade entre 27000 a 33000 cP; sendo que, utilizando-se pH 7,0 ou 7,5 resulta numa concentração de xantana cerca de três a oito vezes inferior,  $Y_p/s$  três a quatro vezes e meia inferiores e viscosidade três a doze vezes inferior.

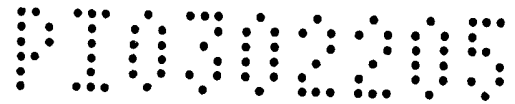
**6ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 5,  
25 caracterizado por a propagação celular ser feita através do método de subcultivos assépticos ou não, utilizando-se como inóculo para a etapa posterior um volume de 5-15% do cultivo da etapa anterior,



onde, a forma de alimentação do meio de cultivo pode ser feita pelos processos: “Batch”, definido aqui como Batelada simples, ou seja, coloca-se todo o meio de cultivo de uma só vez no fermentador e retira-se o caldo fermentado no final do processo; 5 “Fed-Batch”, traduzido como Batelada Alimentada e definido aqui como o processo de alimentação ou enchimento do meio de cultivo de forma gradual, respeitando o tempo de enchimento do processo, e a retirada do caldo fermentado é feita de uma só vez no final; ou “Contínuo”, processo onde a alimentação do meio de cultivo e a 10 retirada do caldo fermentado são feitos simultaneamente e na mesma vazão, sendo que os “Batch ou “Fed-Batch” evitam contaminações e dão maior agilidade nessa etapa.

**7ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 6, 15 caracterizado por o tempo de cultivo para cada etapa da fase de propagação celular dependerá do processo utilizado variando de 5 a 48 horas, no processo Batch, sendo a alimentação otimizada do caldo no processo “Fed Batch” ou Contínuo deverá ser realizada com o tempo de enchimento do fermentador, quando o teor de 20 açúcar no meio de cultivo cair aproximadamente à metade, de modo que o término da fermentação nesses dois últimos processos se dará quando o teor de açúcares redutores totais atingir níveis inferiores a 1%, em amostras onde a goma é previamente removida.

**8ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 7, 25 caracterizado por os equipamentos a serem utilizados no cultivo dependerão do volume em questão, sendo para pequenos volumes,

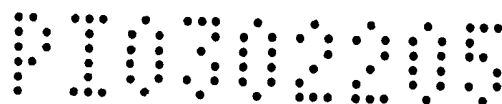


até 3 litros, podem ser utilizados agitadores orbitais, estufas bacteriológicas ou equipamento “banho-maria” com agitação orbital e, para volumes superiores, deve-se utilizar aparelhos do tipo fermentadores, consistindo de vasos de aço, vidro ou plástico resistente, com uma relação de diâmetro:comprimento que pode 5 variar de 1:1 até 1:10, devendo ser utilizada a faixa variável de proporções 1:1 à 1:2.

**9ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 8, 10 caracterizado pelo fato de que tais equipamentos deverão conter controles automáticos ou manuais, de temperatura, pH, alimentação de ar, numa faixa de 0,1 a 2 vvm (volume de ar por volume de tanque por minuto), ou oxigênio, em volumes 10% inferiores, e agitadores mecânicos com defletores.

**10ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 9, 15 caracterizado pelo fato de terminada a fase de propagação celular tem-se o inóculo, suspensão de células no caldo fermentado, que serve para a fase seguinte, onde a produção de xantana se dá pela reação de conversão da glicose, sacarose ou outros açúcares catalisada pela bactéria inoculada no meio de cultivo, sendo que 20 nessa fase a produção de células deve ser minimizada para maximizar a produção da xantana.

**11ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 10, 25 caracterizado pelo fato de utilizando-se o pH = 7,0 no caldo na fase de produção de xantana obtém-se entre 20-30 g/l de xantana, Yp/s 0,35-0,50, e viscosidade entre 27000 a 33000 cP e com pH inferior

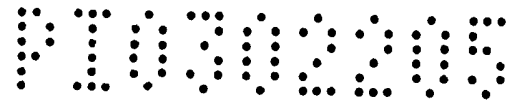


(6,0) ou superior (7,5) resulta numa concentração de xantana cerca de duas vezes e meia a seis vezes inferior, Y p/s duas a três vezes e meia inferior e viscosidade cerca de duas a cinco vezes inferior.

**12ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de o meio de cultivo a ser utilizado na fase de produção da xantana pelo processo "Batch" consiste de sacarose, glicose ou derivados hidrolisados, 1 a 5%,  $K_2HPO_4$  0,1-0,7%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01-0,04%,  $(NH_4)_2SO_4$  0,1-0,4%, ácido cítrico 1-3%,  $H_3BO_3$  0,002-0,0010 g/l, ZnO 0,002 – 0,015 g/l,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0,0012-0,0036 g/l,  $CaCO_3$  0,01-0,05 g/l,, sendo que, alternativamente à sacarose comercial, pode-se utilizar açúcar líquido, HTM (high titer molasses), ou melaço de cana, reduzindo os outros componentes acima mencionados em função da composição química desses produtos.

**13ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de no processo "Batch" utilizando-se 4% de sacarose no caldo de produção de xantana, em 60 horas de reação obtém-se entre 20-30 g/l de xantana, Yp/s 0,35-0,50, e viscosidade entre 27000 a 33000 cP., sendo que, com concentrações iguais ou superiores a 6% de sacarose, resulta numa concentração de xantana maior ou igual a 3,8 vezes inferior, Y p/s 3,3 vezes inferior ou mais, e viscosidade maior ou igual a 2,4 vezes inferior àquela obtida com 4% de sacarose.

**14ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de utilização do o processo "Fed-Batch" ou



contínuo de alimentação do fermentador, a concentração de sacarose e os outros nutrientes do meio de produção da xantana, podem ser aumentadas de 2 a 10 vezes, conforme o tempo de enchimento do fermentador no processo Fed-Batch ou do açúcar residual no fermentador, não superior à 5%, nos processos contínuo  
5 ou Fed-Batch.

**15ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de o tempo da fermentação na fase de  
10 produção do biopolímero poder variar de 48 a 120 horas, caracterizado pelo término da produção da xantana, que deve ser estimada através de amostragens, precipitação com etanol numa relação igual ou superior a 3:1 (etanol:amostra) e secagem da goma à 35-105°C.

**15 16ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de o caldo fermentado poder ser seco diretamente por atomizador ou "Spray drier" ou "Roll drier" ou em estufas de ar forçado, sendo que para a técnica de "Spray drier"  
20 usar temperaturas de entrada do sistema de tal forma que a temperatura de saída não torne o produto pegajoso ou empelotado, sendo que, o caldo fermentado pode ser separado das células previamente à secagem, através da centrifugação em centrífuga de boquilha ou deslocamento automático, com 6000 x g (força  
25 gravitacional), cujos procedimentos aqui serão descritos como método A de separação da xantana com ou sem células.

**17ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 16,



caracterizado pelo fato de o caldo fermentado poder ser centrifugado e, em seguida, concentrado em concentrador à vácuo ou não, podendo ser usados concentradores em forma de tanques (tachos), ou outros tipos disponíveis para produção de açúcar; dependendo do interesse, após a concentração pode ou não ser seco, conforme descrito anteriormente, sendo tal método aqui descrito como método B de separação da xantana, com eliminação de células, concentração do caldo e secagem da goma.

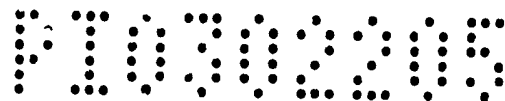
**18ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de o caldo fermentado poder ser centrifugado e concentrado e, em seguida, submetido a uma precipitação com solventes orgânicos, etanol, éter ou álcool isoamílico, com o etanol em concentração de 90-100 GL, numa proporção de 2:1 à 5:1 (etanol:caldo fermentado, vol./vol.) dependendo da concentração da goma no caldo e, após o contato com o solvente a goma precipita e se torna insolúvel, podendo ser centrifugada em centrífugas de cesto, boquilha ou de descarga intermitente; ou a amostra pode ser filtrada, em filtros do tipo peneiras estáticas ou rotativas ou outros sistemas de filtração, com porosidade de 30-200 mesh, ou a combinação de filtros seguindo um gradiente de porosidade, sendo que a secagem pelo método pode ser feita em estufas, ou esteiras rolantes e com fluxo de ar quente, sendo o tal método aqui descrito como método C de separação da xantana, tratando-se assim, do produto mais puro.

**19ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, conforme a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que para maior purificação da goma,

PI030295

pode-se ainda ressuspender a xantana, obtida por qualquer um dos três métodos, em solução aquosa e precipita-la novamente com os solventes e proporções já descritos, eliminando assim, íons e outras moléculas residuais, purificando ainda mais a xantana, sendo que  
5 as etapas seguintes, separação e secagem, são feitas conforme já descrito no método C.

**20ª) - MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA,** conforme a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de no caso da xantana ser obtida de forma  
10 seca, está pode ser moída para atingir a granulação desejada em moinhos tipo faca e/ou martelo.



## RESUMO

**MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**, o qual se refere a um processo biológico de produção da goma xantana através da propagação celular das bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e/ou *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e/ou *Xanthomonas* spp, em cultivos biotecnológicos em condições específicas, bem como etapas de separação e purificação do molécula, sendo que, nessa invenção é utilizado para comprovar a otimização do processo de produção da xantana, parâmetros específicos quantitativo, tais como o rendimento do produto (goma xantana produzida pelo açúcar consumido), aqui simbolizado  $Y_p/s$ ; e qualitativo, onde é utilizada a viscosidade da goma (medida em solução aquosa a 3% (em cP a 25°C. e 6 rpm), já que essa é a principal propriedade desejável na aplicação industrial desse produto.