



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

(11) (21) **PI 0304053-4 A**



(22) Data de Depósito: 28/10/2003
(43) Data de Publicação: 28/06/2005
(RPI 1799)

(51) Int. Cl⁷ :
C12P 19/06
C12R 1/41

(54) Título: **POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO**

(71) Depositante(s): Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (BR/SP) , Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR/SP)

(72) Inventor(es): Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

(74) Procurador: Roque Aloisio Schardong

(57) Resumo: "POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO". A presente invenção se refere a um processo biológico de produção de um bipolímero de polissacarídeo com propriedades similares a goma xantana por microorganismos do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, propondo a conformação de uma goma do tipo xantana que seja obtida por meio de microorganismos não patogênicos, ou seja, o microorganismo que é utilizado para a produção da goma trata-se de uma bactéria solo fixadora do nitrogênio atmosférico, portanto, benéfica, não causando danos a plantas de interesse agrícola ou ao meio ambiente, bem como não apresenta a pigmentação amarelada característica das gomas atualmente produzidas, fato este que reduz os custos de recuperação do polímero, sendo que o processo consiste na inoculação de um meio de cultura rico a partir de placas com as bactérias em fase log de crescimento. O meio inoculado deve ser usado para iniciar a produção através da inoculação de meio de produção em fermentadores. Após 4 a 5 dias de cultivo a goma produzida é precipitada com álcool, seca e moída.

**POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS
COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA
TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO.**

Campo de aplicação:

5 A presente invenção se refere a um processo biológico de produção de um bipolímero de polissacarídeo com propriedades similares a goma xantana por microorganismos do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Estado da técnica:

10 Como é de conhecimento dos habilitados nesta área, a goma do tipo Xantana, é utilizada na indústria alimentícia, bem como na de cosméticos, além de ser utilizada na produção de papel e tinta, bem como na prospecção de petróleo como fluído de perfuração.

15 A goma xantana é um heteropolissacarídeo com a estrutura primária consistindo de repetidas unidades de pentassacarídeo composto por duas unidades de glicose, duas de manose e uma unidade de ácido glucorônico e uma taxa molar de 2:8:2:2. Esta goma é produzida por bactérias da família
20 *Pseudomonaceae* do gênero *Xanthomonas*, sendo que, todos os organismos deste gênero são fitopatógenos. As *Xanthomonas* infectam um grande número de plantas de interesse agrícola tal como feijão, alfafa, repolho, citrus, etc.

Sua aplicação industrial é muito ampla e tem sido usada
25 como aditivo na produção de uma grande variedade de alimentos, pois a mesma provoca a estabilização de emulsões, a estabilização de temperatura, bem como apresenta compatibilidade com os

ingredientes de alimentos industrializados e também devido a suas propriedades reológicas pseudoplásticas.

Devido às suas propriedades no espessamento de soluções aquosas, atuando como agente dispersante e estabilizante de emulsões e suspensões, a mesma é utilizada em formulações farmacêuticas, cosméticas e produtos agrícolas. Dita goma é também utilizada em corantes usados na indústria têxtil, na indústria cerâmica, bem como na formulação de explosivos e removedores de ferrugem.

Com a alta viscosidade e a solubilidade em água do polímero, criaram-se importantes aplicações da goma na indústria do petróleo, onde a mesma é utilizada como fluído na perfuração e nos processos de recuperação do petróleo.

Assim sendo, como a goma, geralmente é obtida por meio de microrganismos, tal como a bactéria *Xanthomonas*, a qual pode causar danos em diversas plantas de interesse agrícola e, em caso de um acidente em uma fábrica produtora da mesma, os danos às plantações próximas seriam irreparáveis, causando um grande prejuízo aos produtores.

Outra característica da goma produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*, é o fato de apresentar uma coloração amarela, devido a sua pigmentação e, desta maneira, os custos de produção e de recuperação do polímero são muito elevados.

No Brasil, a goma Xantana é geralmente importada, sendo que no ano de 2001 (conforme dados da CACEX) aproximadamente 1.800 toneladas desta goma foram importadas, ou seja, o custo de utilização da mesma é muito elevado para a indústria nacional.

Objetivos da invenção:

A presente invenção propõe a conformação de uma goma do tipo xantana que seja obtida por meio de microrganismos não patogênicos, ou seja, o microrganismo que é utilizado para a
5 produção da goma trata-se de uma bactéria solo fixadora do nitrogênio atmosférico, portanto, benéfica, não causando danos a plantas de interesse agrícola ou ao meio ambiente.

Outra característica do presente invento é o fato de ser produzida em território e com matéria-prima nacional,
10 proporcionando assim, um menor custo de produção.

Outra característica do presente invento, é o fato de a goma obtida não apresentar a pigmentação amarelada das gomas atualmente produzidas, fato este que reduz os custos de recuperação do polímero.

15 Assim, o presente invento descreve a produção de exopolissacarídeos por uma bactéria do gênero *Rhizobium* em quantidades adequadas à exploração industrial.

Desta maneira, para melhor esclarecer a invenção acima proposta, é apresentada em seguida uma descrição
20 detalhada da mesma, salientando os seguintes aspectos: a) meios de crescimento para obtenção do inoculo e o meio necessário para a produção da goma rizobiana; b) as condições de crescimento e c) composição dos exopolissacarídeos.

Descrição detalhada do invento:

25 As bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em associação com plantas da família das leguminosas fixam o nitrogênio atmosférico beneficiando-as com a amônia produzida que é então incorporada nos compostos nitrogenados tais como

proteínas e ácidos nucléicos. Assim sendo, este microrganismo difere radicalmente da bactéria *Xanthomonas campestris* que é um fitopatógeno para inúmeras plantas e que vem sendo utilizado desde 1964, para a produção da goma xantana.

5 As gomas são produzidas por bactérias como exopolissacarídeos (EPS), os quais diferem na sua composição e na quantidade produzida, quando em meios complexos ou definidos.

 As bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*
10 são conhecidas por produzirem EPS em pequenas quantidades quando cultivadas em meios de cultura complexos, tais como os que contêm extrato de levedura e manitol (YML). O EPS produzido por bactérias destes gêneros é denominado como goma rizobiana.

 As estirpes isoladas de *Rhizobium* isoladas de raízes de
15 leguminosas produzem, sob condições aeróbicas, uma goma rizobiana (tipo xantana) com características reológicas apropriadas para exploração comercial nos mais diversos campos da indústria.

 O processo para sua produção em quantidade adequada compreende: processo de inoculação, meio de cultura
20 para produção da goma, condições de crescimento, precipitação da goma e composição da goma rizobiana.

 O processo de inoculação inicia-se pela transferência do microrganismo de um meio complexo sólido (YMA) para um volume pequeno de meio complexo líquido (YMB) sendo sua incubação
25 limitada em 48 – 72 horas, em temperatura entre 28 – 30°C com agitação de 200rpm para impedir uma produção de goma e proporcionar um significativo aumento do número de bactérias. Esta cultura é transferida para produção no meio PGR. O volume do

inoculo para produção fica entre 5 – 20% do volume total do meio de cultura no fermentador.

O meio de cultura para produção da goma rizobiana (PGR) foi desenvolvido com baixo custo, sendo composto por:

- 5 a) uma fonte de carbono convencional, podendo ser usado manitol, glicerol, glicose, sacarose ou frutose em concentração variando de 10 – 40 g/L;
- b) uma fonte de nitrogênio que pode ser nitrato de amônia, glutamato de sódio, nitrato de sódio, extrato de levedura ou
10 outra fonte compatível qualquer, em concentração de 1 – 3g/L;
- c) os sais de fosfatos, K^2HPO_4 e K_2PO_4 e o sal de magnésio $MgSO_4$ são adicionados ao meio de cultura em quantidade de 0,1 a 1,5g/L;
- 15 d) elementos traços (1mL/L) contendo cloreto de manganês, cloreto de cálcio, sulfato de ferro, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de zinco, ácido bórico e molibdato de sódio em concentrações variando de 50mg/L a 5g/L.

Os componentes do meio PGR são diluídos em água e o
20 pH ajustado para 5,0 – 7,0 e o meio é esterilizado por autoclavagem (1atm de pressão, 121°C por 20 minutos)

O inoculo bacteriano, previamente crescido em meio YMB por 48 – 72 horas a 28°C – 30°C e à agitação de 100 – 300 rpm, contendo aproximadamente 2×10^9 a 2×10^{10} células/mL, é
25 adicionado ao meio de produção de goma rizobiana (PGR). A cultura é levada ao agitador orbital com temperatura fixada em 28°C – 30°C e agitação programada para 100 – 300 rpm durante 96 – 120 horas.

Após esta etapa é prevista a precipitação da goma, sendo que, para cada litro de cultura crescida no meio PGR é adicionado KCl (2% a 4%) e após a total dissolução do sal por agitação suave, um volume de etanol a 95% ou isopropanol é adicionado precipitando a goma. A qual é recolhida e levada a
5 estufa ajustada para 40 – 55°C para secagem e em seguida reduzida a pó. Tal procedimento leva a produção de 15 – 20 gramas da goma sem o pigmento amarelo observado nas gomas obtidas da bactéria *Xanthomonas campestris*.

10 Desta maneira, a composição preliminar da goma rizobiana determinada por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) mostra que a obtida da estirpe de *Rhizobium* sp JAB3 apresenta cerca de 30% de manose, 35% de glicose, 15% de galactose e cerca de 2% de ramnose. As análises por RMN e
15 FTIR revelam que a goma rizobiana apresenta cerca de 5 – 6 % de acetato, 15 – 18% de ácido glucurônico e 5 – 6% de piruvato.

Apenas para exemplificar o uso do presente invento, o mesmo é comparado com uma amostra de goma xantana comercial como viscosificante em fluidos de perfuração.

20 A amostra J3 foi macerada até se obter um sólido pulverizado, para facilitar a dispersão. As avaliações reológicas foram realizadas em um reômetro_marca Haake, modelo RheoStress RS-100 e em um viscosímetro Fann modelo 35A. A geometria utilizada no RS-100 foi de cone-placa, 60 mm de diâmetro e ângulo
25 de inclinação de 2°. A temperatura de teste foi mantida a 20°C. A faixa de taxa de cisalhamento analisada variou entre 0,1 e 1500 s⁻¹. As varreduras de frequência foram feitas de 0,1 a 100 rad/s. A amostra J3 e uma amostra comercial de goma xantana foram

dispersas em um fluido-base contendo apenas sais P.A. para simular uma solução salina. A Tabela 1 contém a composição do fluido-base. Após dispersão, as amostras foram condicionadas sob rolamento em células pressurizadas (150 psi) a 50°C por 16h.

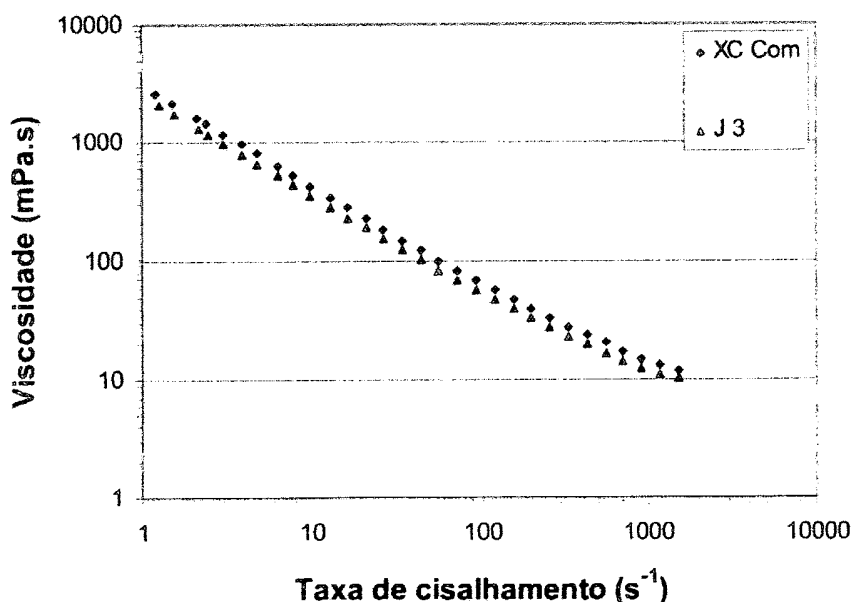
5

Tabela 01

Aditivo	Concentração (g/L)
Água deionizada q.s.p.	q.s.p.
NaCl (P.A.)	60
CaCl ₂ (P.A.)	0,2
Mg Cl ₂ (P.A.)	0,08
Bipolímero	4,28
NaOH	p/ pH 9

A Figura 1 mostra os dados relativos ao comportamento viscosimétrico da amostra J3 (objeto do presente invento) e uma goma xantana comercial (aqui denominada XC).

10

Figura 01

O comportamento das curvas de fluxo apresentaram um comportamento do modelo de Lei da Potência. A Tabela 2 mostra

os valores das constantes K (índice de consistência) e n (índice de comportamento).

Tabela 2

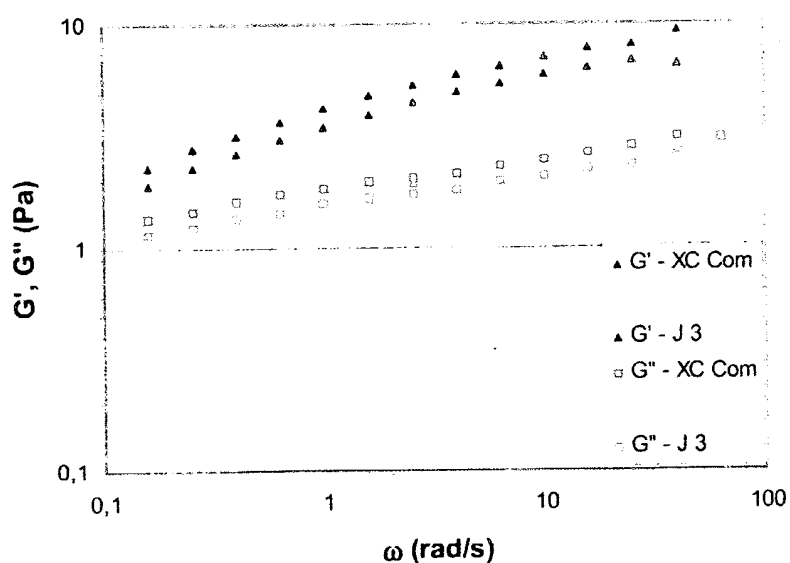
Amostra	K (mPa.s ^{n})	n	r^2
XC Comercial	2619,5	0,2219	0,9956
J3	2153	0,2247	0,9956

5 As amostras XC e J3 apresentaram perfil reológico próximo, com valores de viscosidade para uma mesma taxa de cisalhamento um pouco menor para a amostra J3.

A investigação do comportamento viscoelástico obtido no reômetro e da força gel obtida no viscosímetro possibilita uma
10 melhor compreensão e previsão para capacidade de sustentação.

Na Figura 2 é exibido o resultado de varredura de frequência à deformação constante, escolhida no patamar de viscoelasticidade linear.

Figura 02



As amostras XC e J3 apresentaram comportamento viscoelástico semelhante, com valores de módulo de armazenamento, G' , sempre maiores para a amostra de XC.

A Tabela 3 contém os valores da força gel obtida a 10 segundos e 10 minutos. Tais resultados corroboram com os obtidos para o comportamento viscoelástico.

Amostras	Gel a 10 segundos (Lbf/100 ft ²)	Gel a 10 minutos
XC	9	14
J3	9	10

De acordo com os testes reológicos realizados, foi identificado um grande potencial para utilização da goma polimérica J3 como aditivo viscosificante para fluidos de perfuração à base de água.

REIVINDICAÇÕES

1ª) - POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS
COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA
TIPO XANTANA, caracterizado por ser produzido por meio de
5 bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

2ª) - POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS
COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA
TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO, conforme
descrito na reivindicação 1, caracterizado por o processo de
10 inoculação iniciar-se pela transferência do microrganismo de um
meio complexo sólido (YMA) para um volume pequeno de meio
complexo líquido (YMB) sendo sua incubação limitada em 48 – 72
horas, em temperatura entre 28 – 30°C com agitação de 200rpm
impedindo a produção de goma e proporcionando um significativo
15 aumento do número de bactérias, sendo esta cultura transferida
para produção no meio PGR, de modo que o volume do inóculo
para produção fica entre 5 – 20% do volume total do meio de cultura
no fermentador.

3ª) - POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS
20 COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA
TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO, conforme
descrito nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por o meio de
cultura para produção da goma rizobiana (PGR) ser de baixo custo,
sendo composto por:

25 a) uma fonte de carbono convencional contendo: manitol,
glicerol, glicose, sacarose ou frutose em concentração
variando de 10 – 40 g/L;

- b) uma fonte de nitrogênio, contendo nitrato de amônia, glutamato de sódio, nitrato de sódio, extrato de levedura de nitrogênio ou qualquer outra fonte compatível de nitrogênio, utilizadas em concentração de 1 – 3g/L;
- 5 c) os sais de fosfatos, K^2HPO_4 e K_2PO_4 e o sal de magnésio $MgSO_4$ são adicionados ao meio de cultura em quantidade de 0,1 a 1,5g/L;
- d) solução de elementos traços (1mL/L) contendo cloreto de manganês, cloreto de cálcio, sulfato de ferro, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de zinco, ácido bórico e
10 molibdato de sódio em concentrações variando de 50mg/L a 5g/L.

4ª) - POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO, conforme
15 descrito na reivindicação 3, caracterizado por os componentes do meio PGR serem diluídos em água e o pH ajustado para 5,0 – 7,0 e o meio ser esterilizado por autoclavagem (1atm de pressão, 121°C por 20 minutos).

5ª) - POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO, conforme
20 descrito nas reivindicações anteriores, caracterizado por o processo de inoculação iniciar-se pela transferência do microrganismo de um meio complexo sólido (YMA) para um volume pequeno de meio complexo líquido (YMB), sendo sua incubação limitada em 48 – 72
25 horas, em temperatura entre 28 – 30°C com agitação de 200rpm impedindo a produção de goma e proporcionando um significativo

aumento do número de bactérias, sendo esta cultura transferida para produção no meio PGR, de modo que o volume do inóculo para produção fica entre 5 – 20% do volume total do meio de cultura no fermentador.

5 **6ª) - POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS
COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA
TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO**, conforme
descrito nas reivindicações anteriores, caracterizado por o inóculo
bacteriano, previamente crescido em meio YMB por 48 – 72 horas a
10 28°C – 30°C e à agitação de 100 – 300 rpm, contendo
aproximadamente 2×10^9 a 2×10^{10} células/mL, ser adicionado ao
meio de produção de goma rizobiana (PGR), de modo que a cultura
é levada ao agitador orbital, com temperatura fixada em 28°C –
30°C e agitação programada para 100 – 300 rpm durante 96 – 120
15 horas.

**7ª) - POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS
COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA
TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO**, conforme
descrito nas reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de
20 que as células bacterianas serem eliminadas por centrifugação e
para cada litro de meio PGR recuperado ser adicionado KCl (2% a
4%) e após a total dissolução do sal por agitação suave, um volume
de etanol a 95% ou isopropanol é adicionado precipitando a goma
que, por sua vez é recolhida por centrifugação continua e levada à
25 estufa ajustada para 40 – 55°C, para secagem e, em seguida,
reduzida a pó por moagem resultando em um produto, branco, fino
e sem pigmento amarelo.

**8ª) - POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS
COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA
TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO**, conforme
descrito nas reivindicações anteriores, caracterizado por a
5 composição preliminar da goma rizobiana mostrar que a obtida da
estirpe de *Rhizobium sp* JAB3, apresenta cerca de 30% de manose,
35% de glicose, 15% de galactose e cerca de 2% de ramnose.

**9ª) - POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS
COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA
10 TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO**, conforme
descrito nas reivindicações anteriores, caracterizado por a goma
rizobiana apresentar cerca de 5 – 6 % de acetato, 15 – 18% de
ácido glucurônico e 5 – 6% de piruvato.

RESUMO

POLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS COM PROPRIEDADES REOLÓGICAS SEMELHANTES À GOMA TIPO XANTANA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO,

5 invenção se refere a um processo biológico de produção de um
bipolímero de polissacarídeo com propriedades similares a goma
xantana por microorganismos do gênero *Rhizobium* e
Bradyrhizobium, propondo a conformação de uma goma do tipo
xantana que seja obtida por meio de microrganismos não
10 patogênicos, ou seja, o microrganismo que é utilizado para a
produção da goma trata-se de uma bactéria solo fixadora do
nitrogênio atmosférico, portanto, benéfica, não causando danos a
plantas de interesse agrícola ou ao meio ambiente, bem como não
apresenta a pigmentação amarelada característica das gomas
15 atualmente produzidas, fato este que reduz os custos de
recuperação do polímero, sendo que o processo consiste na
inoculação de um meio de cultura rico a partir de placas com as
bactérias em fase log de crescimento. O meio inoculado deve ser
usado para iniciar a produção através da inoculação de meio de
20 produção em fermentadores. Após 4 a 5 dias de cultivo a goma
produzida é precipitada com álcool, seca e moída.