



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019024150-0 A2



(22) Data do Depósito: 14/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 18/05/2021

(54) **Título:** BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE PARA APLICAÇÃO COMO EMULSIFICANTE ALIMENTÍCIO

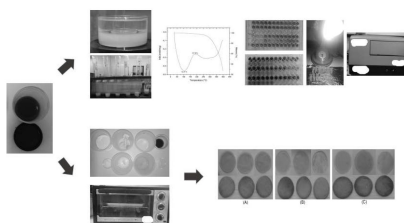
(51) **Int. Cl.:** C12P 1/02; C12R 1/865; C12N 1/18.

(52) **CPC:** C12P 1/02; C12R 1/865; C12N 1/18.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** BEATRIZ GALDINO RIBEIRO; JENYFFER MEDEIROS CAMPOS GUERRA; LEONIE ASFORA SARUBBO.

(57) **Resumo:** BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE PARA APLICAÇÃO COMO EMULSIFICANTE ALIMENTÍCIO A utilização dos biossurfactantes desperta grande interesse industrial em função da diversidade de estruturas e produção a partir de fontes renováveis, obtendo produtos resistentes às técnicas de processamento utilizadas nas indústrias. O biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae* foi produzido em meio contendo óleo de fritura de soja e milhocina, mantido a 28 °C a 150 rpm por 120h. O biossurfactante isolado por método otimizado foi caracterizado como glicolipídio, apresentando em sua composição 80,0% de lipídios e 19,6% de carboidratos, com característica molecular de éster. Apresentou emulsões estáveis em três diferentes concentrações frente óleos vegetais, estabilidade térmica até 320 °C e atividade antioxidante frente dois ensaios distintos, parâmetros importantes para utilização na indústria alimentícia. O biossurfactante produziu boas formulações de biscoitos substituindo-se parcialmente e totalmente a gema do ovo pasteurizada da formulação original, com melhorias no perfil de textura da massa antes e após cocção. Desta forma, o biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae* apresentou boa estabilidade e aplicabilidade como componente de formulação de biscoitos.



BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Saccharomyces cerevisiae* PARA APLICAÇÃO COMO EMULSIFICANTE ALIMENTÍCIO

01. A presente invenção refere-se a um composto, biossurfactante, com propriedade emulsificante e antioxidante produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

→ Estado da técnica

02. Na indústria de alimentos, são largamente empregados os emulsificantes sintéticos, os quais apresentam um papel decisivo na formação de emulsões bem sucedidas, bem como, com a sua utilização, aumenta-se suficientemente a vida de prateleira dos produtos pela minimização da separação das fases. Embora sejam extremamente eficientes, esses aditivos têm sofrido restrições, especialmente por parte dos consumidores, em função das exigências de redução do uso de aditivos “artificiais” ou quimicamente sintetizados em alimentos (MCCLEMENTS; GUMUS, 2017).

03. Neste sentido, a demanda por produtos mais naturais foi crescendo ao longo dos anos, resultando em novas formulações a partir de vegetais, como a lecitina de soja e a goma arábica, as quais apresentam atualmente vasta aplicação e aceitação comercial. Entretanto, existem algumas limitações com o uso destes emulsificantes frente às condições de cocção em micro-ondas e irradiação, aumentando-se o interesse em produzir, isolar e identificar novos emulsificantes (NITSCHKE; COSTA, 2007; McCLEMENTS; GUMUS, 2017).

04. Novos aditivos com propriedades espessantes e estabilizantes semelhantes aos aditivos utilizados comercialmente vêm sendo altamente estudados e produzidos. Além disso, a busca por estes novos produtos reduz a dependência e utilização dos emulsificantes vegetais

oriundos, na maioria das vezes, de plantas geneticamente modificadas, como a soja. Neste contexto, os biossurfactantes apresentam-se como melhor alternativa, uma vez que são de origem microbiana e apresentam maior resistência às condições adversas, comumente encontradas em processamento de alimentos (CAMPOS et al., 2015; ZOUARI et al., 2016).

05. Estes agentes tensoativos apresentam a capacidade de diminuir a energia superficial entre as fases e formar barreiras estereostáticas e eletrostáticas, impedindo a coalescência das partículas. Entretanto, na indústria alimentícia, os aditivos para emulsificação e dispersão não necessitam necessariamente da capacidade de reduzir a tensão superficial da água ou dos hidrocarbonetos, desde que atuem como bons emulsificantes (CAMPOS et al., 2013). Os biossurfactantes constituídos de glicolipídeos geralmente atuam como bons emulsificantes em sistemas óleo-água, apesar de apresentarem peso molecular baixo. Alguns autores já utilizaram os surfactantes microbianos em alguns alimentos como maioneses, molhos e alimentos funcionais, atuando como agentes emulsificantes eficazes, melhorando a consistência e textura (CAMPOS et al., 2019).

06. Os biossurfactantes também podem ser utilizados para aumentar a vida útil dos produtos, devido às suas propriedades antioxidante e antimicrobiana. Além disso, apresentam-se eficazes na solubilização de óleos vegetais e aromas, na estabilização de gorduras durante o processo de cocção, e até mesmo na melhoria das propriedades organolépticas em pães e formulações de sorvetes (KIELISZEK et al., 2017).

07. A utilização industrial dos biossurfactantes, entretanto, tem sido dificultada em virtude dos altos custos de produção associados à métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos

caros. Por outro lado, estes custos podem ser significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes de baixo custo, bem como através da obtenção de altos rendimentos em produto (SANTOS et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017). Pesquisas relacionadas com a otimização da produção de biossurfactantes a partir de substratos oleosos regionais ou glicose demonstraram a produção desses compostos por *Candida lipolytica* (SANTOS et al., 2017), enquanto outras, a utilização de resíduos industriais (CAMPOS, STAMFORD; SARUBBO, 2014; RUFINO et al., 2014; SOARES DA SILVA et al., 2017; CHAPRÃO et al., 2018).

08. Entre os microrganismos produtores de biossurfactantes estão as leveduras, as quais têm apresentado grande potencial para utilização, visto que industrialmente são extremamente empregadas. Além disso, uma grande vantagem consiste no fato de serem incluídas no status GRAS (em inglês, Generally Regarded As Safe - geralmente reconhecido como seguro), como a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, pois não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, permitindo, por exemplo, sua utilização na indústria de alimentos (ELSHAFIE et al., 2015; SOUZA et al., 2017). Além de tudo, seu percentual de recuperação do subproduto é considerado alto, comparado com os valores de rendimento de emulsificantes derivados de outras leveduras (SRIDHAR et al., 2015; SELVAKUMAR; ANIBABIYANS; MADHAN, 2016).

09. Neste sentido, a proposta em produzir um biossurfactante com atividade de emulsificação a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando como substratos óleo de fritura residual como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio representa uma alternativa na produção de componentes com vantagens econômicas para as indústrias alimentícias do país.

→ **Problemas existentes no estado da técnica**

10. Apesar da aplicação potencial, a indústria de alimentos não utiliza ainda os biossurfactantes como aditivos e componentes de formulações em larga escala. Muitas propriedades dos biossurfactantes, assim como sua regulação em relação à aprovação como novo ingrediente para alimentos, têm que ser resolvidas. A elaboração de testes e avaliação de qualquer novo ingrediente é requerida de acordo com os regulamentos do “U. S. Food and Drug Administration” e este processo pode ser longo. Os fatores a serem considerados nesta avaliação estão relacionados a questões nutricionais, funcionais, sensoriais, biológicas e toxicológicas do novo ingrediente, além disso outros fatores devem ser considerados, tais como fatores econômicos, quando comparados aos surfactantes sintéticos para o mesmo uso, aceitação pelo consumidor, regulação legal e hábitos alimentares dos consumidores (BARROS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2017). Apesar das restrições citadas, a utilização de biossurfactantes em alimentos mostra-se promissora quando são consideradas algumas aplicações já descritas na literatura em produtos lácteos, de panificação, sistemas aerados e molhos para saladas (ZOUARI et al., 2016; CAMPOS et al., 2019).

11. Entretanto, vários trabalhos descritos na literatura sobre a produção de biossurfactantes produzidos por microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e alguns fungos filamentosos, se referem à aplicação na área ambiental principalmente na biorremediação, ou seja, a utilização de compostos surfactantes é bastante atrativa na remoção de contaminantes hidrofóbicos gerados pela indústria de petróleo.

→ **Anterioridade**

12. Com relação ao registro de patentes, são descritas a seguir, em ordem cronológica, as que possuem produção de biossurfactante com interesse ambiental, alimentos e uso de resíduos industriais, bem como de fabricação de biscoitos:

13. Patente EP 0710448 A1 (PETRONIO; SOLZI, 1996) - Biscoito confeccionado à base de flocos de cereais e método para a sua produção. “Descrito um biscoito isento de gorduras adicionadas e inclui de 36 a 90% em peso de flocos de cereais e de 7 a 28% em peso de aglutinante de açúcar. O biscoito é fabricado por cozimento e extrusão de cereais moídos selecionados e descamação e mistura dos flocos com o aglutinante de açúcar. A massa de floco-ligante, que é obtida com um teor de humidade de 15-30%, é finalmente moldada.”

14. Patente PI0305960-0 A2 (CUNHA et al., 2005) - Processo de degradação de hidrocarbonetos e processo de produção de biossurfactantes. “Proporciona-se degradação de hidrocarbonetos que compreende o uso de microorganismos que produzem, simultaneamente, biossurfactantes. Tais microorganismos utilizam derivados do petróleo como fonte de carbono e produzem biossurfactantes, atuando de maneira sinérgica para, por exemplo, eliminar derivados de petróleo de áreas onde ocorreram vazamentos.”

15. Patente PI0519962-0 A2 (BERRY et al., 2005) - Biocatalisador surfactante para remediação de metais orgânicos e pesados recalcitrantes. “O invento refere-se a um biocatalizador surfactante para remediação de metais orgânicos e pesados recalcitrantes com o uso de novas cepas bacterianas. O biossurfactante ainda proporciona uma capacidade adicional de se ligar a íons de metais pesados para remoção de um meio ambiente terrestre e aquático.”

16. Patente BR 0303853 (PASTORE et al., 2005) Processo de produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo da indústria de mandioca. “Apresenta o processo de produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*, utilizando resíduo da indústria de mandioca, a manipueira. Os pesquisadores demonstram que o produto alcança níveis de 80% no refino do petróleo incorporado em areia, além de demonstrar enorme potencial para a indústria alimentícia e de fármacos. O biossurfactante produzido pela espécie de *B. subtilis* é denominada surfactina - um detergente biodegradável. “

17. Patente TW 200528558 A (WEI et al., 2005) Meio de cultura usado para produzir biossurfactante. “Um meio de cultura usado para produzir biossurfactante é divulgado. O meio de cultura, que compreende um meio basal alterado com uma quantidade adequada de íons ferrosos, é usado para o cultivo de microrganismos produtores de biossurfactantes para obter uma grande quantidade de biossurfactante. Os íons ferrosos da invenção são baratos e podem aumentar o rendimento do biossurfactante a um custo menor. Além disso, é fornecido um método de produção de biossurfactante.”

18. Patente PI0705327-4 (PRADELLA et al., 2007) Método de produção de raminolipídeos com diferentes composições de forma controlada. “Descreve o método de produção de raminolipídios com diferentes composições de forma controlada. Os autores demonstram que os óleos vegetais de soja, mamona, milho, algodão e pinhão manso e suas misturas são utilizados como fontes de carbono para a produção do biossurfactante raminolipídios a partir de mutante de *Pseudomonas aeruginosa*. Informam que o produto obtido tem espectro de aplicação nos campos da biorremediação, alimentos, aromas, cosméticos e farmacêuticos.”

19. Patente PI0604094-2 A2 (TÓTOLA; BRITO, 2007) Processo de descontaminação de areias de praia contaminadas com petróleo

utilizando biossurfactante. “O invento refere-se a um processo de descontaminação de areias de praia contaminadas com petróleo utilizando biossurfactante. Sistemas contendo areia de praia, petróleo, fase aquosa (água de torneira ou água do mar) e suspensão microbiana contendo biossurfactante, em quantidades otimizadas, são submetidos a agitação em 30<198>C e 150 rpm por um período em torno de 24 horas. O biossurfactante reduz a tensão interfacial óleo/fase aquosa no processo de descontaminação e promove a partição do petróleo podendo ser recuperado e a areia de praia, livre de contaminantes, é considerada adequada para devolução ao ambiente natural.”

20. Patente JP 2007126469 A (KAWAI; MANERAATO, 2007)

Biossurfactante que um novo microrganismo produz. “PROBLEMA A SER RESOLVIDO: Para fornecer um microrganismo da água do mar que pode ser cultivado por um caldo marinho, em que o óleo bruto é adicionado como uma fonte de carbono e que mostra uma capacidade de emulsificação de óleo bruto. SOLUÇÃO: *Myroides odoratus* SM-1 (número de acesso FERM P-19061) que produz um biossurfactante é obtido. O biossurfactante mostra a capacidade de emulsificação do óleo.”

21. Patente JP 2008187902 A (KITAGAWA et al., 2008) Método

para produção de produtos desconhecidos de biossurfactantes tipo glicolípido. PROBLEMA A SER RESOLVIDO: Fornecer um método para produzir um biossurfactante, tal como o glicolípido, com elevada biodegradabilidade e baixa toxicidade e que seja amigo do ambiente e tenha melhor solubilidade em água para tentar uma ampla disseminação do biossurfactante na indústria alimentar, cosmética, indústria médica, indústria química e campo ambiental, ou similares. SOLUÇÃO: O método para a produção de um produto desconhecido de um biossurfactante do tipo glicolípido compreende a clivagem regiosseletiva do grupo acilo de um biossurfactante do tipo glicolípido utilizando uma hidrolase.”

22. Patente PI0603882-4 A2 (TÓTOLA et al., 2008) Processo de recuperação de óleo e minimização de borra oleosa de tanques de armazenamento de óleo utilizando biossurfactante. “O invento refere-se a um processo de recuperação de óleo e minimização da borra oleosa em tanques de armazenamento. A borra é tratada com suspensão celular contendo biossurfactante que dependerá da quantidade e da composição de borra oleosa presente no tanque. O invento não se constitui em antecedente à patente, pois utiliza biossurfactantes já existentes, enquanto que a patente ora proposta pretende desenvolver um novo biossurfactante com substratos oriundos de matérias-primas de baixo custo.”

23. Patente PI0701873-8 A2 (CRAVEIRO et al., 2009) Microesferas de quitosana com esporos de *Bacillus subtilis* LAMIOO7 não patogênicos mobilizados para uso na biodegradação de hidrocarbonetos, biofertilização, biotratamento de efluentes industriais e domésticos, e produção de biossurfactantes. A presente invenção diz respeito a um produto formado por esporos de *Bacillus subtilis* lamioo7 não-patogênicos, não modificados geneticamente, aprisionados em microesferas de quitosana. esta patente propõe o uso de esporos bacterianos, os quais, ao serem colocados no ambiente germinarão, tornando-se prontamente ativos como biofertilizantes, biodegradadores, biorremediadores em ambientes naturais, domésticos e industriais e produtores de biossurfactantes.

24. Patente TW 200909584 A (CHANG et al., 2009) Método para produção de biossurfactante. “Um método para produzir biossurfactante é divulgado. O presente método é implementado usando um sistema de cultura de pH-stat fed-batch para cultivar microrganismos para produzir o biossurfactante, por meios de fornecimento de meio alimentado para ajustar e estabilizar o valor de pH do meio de cultura de fermentação, bem como no e desenhar de forma a repetir a produção de fermentação

acima mencionada, de modo a reduzir o tempo de re-cultura, a cultura de mais microrganismos, e para alcançar o maior rendimento do biossurfactante glicolipídico. Assim, o presente método pode economizar mais tempo e custo de produção, reduzir o uso de solução alcalina ou meio contendo fonte de nitrogênio e efetivamente aumentar o biossurfactante no rendimento e na concentração. O biossurfactante resultante é ainda aplicado à biorremediação de circunstâncias contaminadas por óleo.”

25. Patente PT 924221 E (PROSPERI et al., 2009) Novo biossurfactante lipopolissacarídeo. “A invenção refere-se a um novo biossurfactante lipopolissacarídico, uma cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* que produz este biossurfactante e um processo para a sua preparação. O biossurfactante possui alta capacidade emulsificante, promove a biodegradação de hidrocarbonetos em água e favorece a adesão de microrganismos à interface água/óleo.”

26. Patente JP 2010200695 A (MORITA et al., 2010) Método para produção de biossurfactante. “PROBLEMA A SER RESOLVIDO: Fornecer um método para produzir um biossurfactante para usar eficientemente a cana-de-açúcar e reduzir o custo de produção. SOLUÇÃO: Um microrganismo é cultivado usando um meio contendo os componentes A e B. O componente A é um componente líquido da cana-de-açúcar e o componente B é uma substância coloidal, exceto os açúcares recuperados do componente líquido da cana-de-açúcar. O microrganismo é um biossurfactante produtor de microrganismos selecionados do grupo constituído por microrganismos da família Ustilaginaceae e microrganismos do gênero *Candida* e gênero *Starmerella*.”

27. Patente PI 1102592-1 A2 (BARBOSA; SOUZA, 2011) Produção de biossurfactante visando desenvolver um biodetergente biodegradável. “A presente invenção conjuga as principais propriedades do sabão e do

detergente sintético em um único produto com o uso de um biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. O biodetergente produzido apresentou um poder espumante e uma ação detergente semelhante quando comparado ao sintético comercial, podendo desta forma ser utilizado em substituição ao mesmo pelas vantagens apresentadas.”

28. Patente EP 2382866 A1 (PETRONIO et al., 2011) Processo para o fabrico de biscoitos que têm propriedades organolépticas melhoradas. “É descrito um processo para a produção de biscoitos, caracterizado por compreender as etapas de misturar os ingredientes de uma massa de biscoito, formar a massa de biscoito para formar produtos semiacabados, assar os produtos semiacabados formados a partir da massa, obtendo assim os biscoitos, arrefecer os biscoitos obtidos e embalar os biscoitos; em que a etapa de cozedura dos produtos semiacabados compreende uma etapa de exposição dos mesmos a um gás quente que consiste em ar quente e vapor sobreaquecido, soprado diretamente sobre os produtos semiacabados por meio de um sistema de impacto. É também dada uma descrição de um biscoito que compreende, em peso por peso total, um teor de fibra dietética compreendido entre 1 e 25%, um teor de lipídeos compreendido entre 4 e 23% e um teor de açúcares simples compreendido entre 8 e 26%.”

29. Patente BR 10 2012 023115 8 A2 (SARUBBO et al., 2012) Processo de obtenção de um biossurfactante produzido por *Candida guilliermondii*. “A presente invenção se refere a um processo de obtenção de um biossurfactante produzido por *Candida guilliermondii*. O processo da presente invenção utiliza um meio de produção constituído por óleo vegetal residual de fritura, resíduo da cana-de-açúcar e resíduo de refinaria de milho.”

30. Patente BR 10 2014 028897 0 A2 (CAMPOS et al. 2014) Complexo lipídio-proteína-carboidrato, seu processo de produção e seu

uso, composição de maionese compreendendo o complexo lipídio-proteína-carboidrato, e meio de cultura. “A presente invenção descreve um complexo lipídio-proteína-carboidrato produzido por *Candida utilis*, o seu processo de produção e seu uso, a aplicação desse complexo em maionese e o meio de cultura utilizado em sua produção. Especificamente, a presente invenção compreende um complexo lipídio-proteína-carboidrato produzido por *Candida utilis* que apresenta aplicabilidade na produção de maionese. Além disso, compreende um processo de produção desse complexo que viabiliza a produção em larga escala. A presente invenção se situa nos campos da microbiologia, química e bioquímica.”

31. Patente KR 101446219 B1 (KIM, 2014) Um novo biossurfactante. “A presente invenção refere-se a um novo composto isolado da levedura e usado como um surfactante biológico. O agente tensoativo biológico da presente invenção tem um forte efeito tensoativo e é seguro para um corpo humano devido à sua capacidade de biodegradação e baixa toxicidade. Além disso, o surfactante biológico da presente invenção é amigo do ambiente porque o surfactante biológico pode ser produzido em massa por cultivo de microrganismos.”

32. Patente US 2014323757 A1 (KIM, 2014) Biossurfactante isolado de levedura. “A presente invenção proporciona um novo composto isolado a partir de levedura e a sua utilização como um biossurfactante. O biotensoativo da presente invenção apresenta elevada atividade tensoativa, é biodegradável e é seguro para o corpo humano devido à sua baixa toxicidade. Além disso, o biossurfactante da presente invenção pode ser amigo do ambiente, produzido através de um cultivo de um microrganismo em grandes quantidades.”

33. Patente JP 2014117240 A (MORI et al., 2014) Método de extração e purificação de biossurfactante. “PROBLEMA A SER

RESOLVIDO: Fornecer um método para extração e purificação eficiente de biossurfactantes. SOLUÇÃO: O método de extração e purificação de biossurfactantes é caracterizado pelo fato de que, a partir de um meio de cultura em que microrganismos produtores de biossurfactantes são cultivados, os biossurfactantes produzidos são extraídos e purificados usando álcool alifático específico.”

34. Patente CN 105771791 A (DONG et al., 2016) Método de extração eficiente de biossurfactante soforolipídico favorável ao meio ambiente. “A invenção divulga um método eficiente de extração de soforolipídeo biossurfactante favorável ao meio ambiente. O método de extração eficiente do biossurfactante soforolipídeo ecológico é simples e seguro no processo de produção, fácil de operar e controlar, e muito adequado para a produção em massa industrializada.”

35. Patente BR 10 2016 019520 9 A2 (SILVA et al., 2016) Biossurfactante obtido por meio alternativo oriundo de material lignocelulósico. “A presente invenção diz respeito ao uso de frações ricas em hemiceluloses oriundas de sabugo de milho, obtida por intermédio de tratamento com compostos alcalinos, para utilização como meio de cultura em processo fermentativo por uso de bactérias do gênero *Bacillus* para produção de biossurfactantes. O invento demonstra caráter inovador pela proposição de tratamento e utilização de um resíduo agrícola ou agroindustrial que não possui valor agregado obtido a partir da cultura do milho (setor agrícola) ou do seu processamento (setor agroindustrial) para que possa ser empregado como fonte de carbono por microrganismos produtores de biossurfactantes. Tais características, por conseguinte, tornam a produção de biossurfactantes empregando fração hemicelulósica sabugo de milho pré-tratado como fonte de carbono uma opção promissora para o setor industrial e biotecnológico, já que haverá diminuição nos custos de produção de

biossurfactantes permitindo assim a substituição progressiva dos surfactantes sintéticos.”

36. Patente BR 10 2017 004811 0 A2 (PARACHIN et al., 2017)

Levedura recombinante para a produção de ramnolipídeos, seu processo de obtenção e uso. “A presente tecnologia se situa no campo técnico da biotecnologia. Refere-se à produção de ramnolipídeos, um tipo de biossurfactante, que permite a redução do uso de surfactantes petroquímicos e, conseqüentemente, a emissão de gases que aceleram o efeito estufa. A produção de ramnolipídeos pelo seu produtor natural, *Pseudomonas aeruginosa* está associada à produção de fatores de virulência. A presente invenção objetivou a construção de cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de ramnolipídeos a partir de sacarose.”

37. Patente CN 108841903 A (DONG, 2018) Método para produção

de biossurfactante através da fermentação por cepa. “A invenção refere-se a um método para produzir um biossurfactante através de fermentação por cepa. Um meio gasoso com alto teor de oxigênio fornece oxigênio a um sistema de fermentação, de modo que o volume de ventilação e a velocidade de agitação de um tanque de fermentação são substancialmente reduzidos, e um processo de fermentação isento de extravasamento do biossurfactante é realizado num reator de agitação convencional; o método tem vantagens de alta taxa de produção, alta taxa de conversão de substrato e similares; na última fase de fermentação, o ar geral é usado como meio; um produto em líquido fermentado é concentrado pela adoção de uma tecnologia de separação de espuma; um novo processo benéfico para a produção industrial do biossurfactante é fornecido.”

38. Patente CN 108823250 A (MOU et al., 2018) Tecnologia

industrial de produção de fermentação para aumentar o rendimento do biossurfactante. “A invenção refere-se a uma tecnologia de produção de

fermentação industrial para aumentar o rendimento de um biossurfactante. De acordo com a tecnologia, no processo de cultura de cepas produtoras de biossurfactante, a fermentação por transbordamento é combinada com regulação e controle de pH-faseado. Em comparação com a técnica anterior, a tecnologia baseia-se nas características de crescimento fisiológico das estirpes, o biossurfactante é separado através de extravasamento e, portanto, a inibição de um produto para o metabolismo é eliminada; e através do controle de pH encenado, as condições de crescimento e ambiente metabólico das bactérias são otimizadas e, portanto, a eficiência de produção é melhorada, e o rendimento do biossurfactante é aumentado.”

39. Patente US 2018272396 A1 (FARMER et al., 2018) Produção microbiana reforçada de biossurfactantes e outros produtos, e suas utilizações. “A presente invenção refere-se a composições e métodos de recuperação microbiana melhorada de óleo usando estirpes de *Bacillus subtilis*. A invenção também se refere a composições e métodos para realizar a degradação do óleo com estirpes de *Bacillus subtilis*. As composições e métodos da presente invenção são também utilizados para o aumento de biossurfactante comercial e produção de enzimas.”

40. Patente CN 108467878 A (GONG et al., 2018) Método para produção de biossurfactante raminolipídico por fermentação sólida. “A invenção divulga um método para produzir um biossurfactante raminolipídico por fermentação sólida. O método tem as seguintes vantagens: o rendimento é alto; o produto contém poucas impurezas, o consumo de energia é baixo; a operação é fácil; o pós-tratamento é simples; a poluição é pequena; o ambiente de fermentação é consistente; a espuma de poliuretano porosa de inércia é estável em desempenho, alta capacidade de ligação à água e reciclável, de modo que o custo de produção é obviamente diminuído; e além disso, todo o processo de fermentação está livre de bolhas, de modo que o gargalo

técnico de um grande número de bolhas no processo de produção de raminolipídeo é resolvido; e o processo de industrialização do biossurfactante raminolipídico é acelerado.”

41. Patente CN 108186477 A (GAO, 2018) Creme clareador e hidratante para a pele e seu método de fabricação. “A invenção divulga um creme para o cuidado de branqueamento e hidratação da pele e um método de fabrico do mesmo. O método de fabricação do creme clareador e hidratante para a pele é simples em tecnologia, o custo do produto pode ser bem controlado, e o creme clareador e hidratante tem o efeito de remover eficientemente a atividade dos radicais hidroxila e não tem nenhum lado efeito; o creme hidratante e de cuidados com a pele é usado externamente para o rosto e para as mãos, pode branquear e suavizar a pele e tem os efeitos únicos de hidratar a pele, resistir ao envelhecimento e afins.”

42. Patente KR 20180057235 A (YOON et al., 2018) Método de biossurfactante usando espécie de *Candida bombicola*. “A presente invenção proporciona um biossurfactante utilizando a estirpe ATCC22214 de *Candida bombicola*. Mais especificamente, o biossurfactante é preparado cultivando a estirpe de *Candida bombicola* num meio de cultura contendo óleo sintético, DEG (PO) 4, o qual é formado pela adição de óxido de propileno a dietilenoglicol. O biossurfactante da presente invenção pode ser utilizado para várias finalidades e, por exemplo, pode ser utilizado como uma composição de limpeza e purificação e também pode ser utilizado na maioria das indústrias que utilizam surfactantes sintéticos químicos, incluindo indústrias farmacêuticas, alimentares e cosméticas.”

43. Patente CN 107996569 A (LI et al., 2018) Aplicação de biossurfactante lipopeptídico em pesticidas. “A invenção proporciona a aplicação de lipopeptídeo biossurfactante em pesticida e refere-se à aplicação de lipopeptídeo como biossurfactante no pesticida. A

composição de lipopeptídeo que é aplicada ao pesticida compreende, em peso, 0,1-30% de componentes eficazes de pesticida, 0-5% de agente tensoativo químico, 15-30% de solvente, 10-50% de solução aquosa de lipopeptídeo e o equilíbrio água. Em comparação com um agente de adição química agrícola tradicional, a aplicação de lipopeptídeo biossurfactante no pesticida tem as vantagens de que o lipopeptídeo biossurfactante é ambientalmente amigável, pequeno em uso e bom em compatibilidade com água e não tem efeito antagônico na maioria dos medicamentos originais; Enquanto isso, o lipopeptídeo também tem o efeito antibacteriano, e o líquido de fermentação é rico em vários elementos que são exigidos pelo crescimento da planta. Uma preparação de pesticidas à base de água que é preparada com lipopeptídeo está de acordo com a política chinesa de industrialização da proteção ambiental e é uma substituição ideal do surfactante químico agrícola.”

44. Patente WO 2018079620 A1 (TSUJI, 2018) Composição gelatinosa. “A presente invenção aborda o problema de proporcionar uma composição gelatinosa que apresenta uma elevada afinidade para a pele e que apresenta uma excelente estabilidade temporal, mantendo ao mesmo tempo uma sensação suave na utilização. A composição gelatinosa de acordo com a presente invenção é caracterizada por compreender um biossurfactante, água e/ou um álcool poli-hídrico, um componente de óleo e um composto de anel de sete membros insaturado, em que o composto de anel de sete membros insaturado está contido numa quantidade de 0,01-3% em peso e é gelatinoso.”

45. Patente WO 2019094615 A1 (FARMER et al., 2019) Composição multifuncional para a recuperação avançada do óleo, melhoria da qualidade do petróleo e prevenção da corrosão. “A presente invenção proporciona composições e métodos para melhorar simultaneamente a recuperação do óleo, melhorando a qualidade de óleo e gás através da

redução em compostos contendo enxofre, e prevenir e/ou reduzir a corrosão de equipamento de produção de petróleo e gás. É proporcionada uma composição multifuncional compreendendo um componente biossurfactante antimicrobiano, um primeiro sal de amônio e hidróxido de amônio. Em algumas formas de realização, a eficiência da composição é ainda aumentada pela adição de um agente quelante, um fenol (por exemplo, ácido carbólico ou ácido fenólico) e/ou um sequestrante de H₂S. Em algumas formas de realização, a composição é ainda melhorada para utilização em climas frios pela adição de uma mistura anticongelante compreendendo um ou mais de um segundo sal de amônio, cloreto de sódio e glicerol.”

46. Patente WO 2019090401 A1 (FERNANDES, 2019) Processo para obter um extrato urucum melhorado através da utilização de um biossurfactante e inspeção da preparação de formulações cosméticas, farmacêuticas e nutricionais. “A presente invenção refere-se ao campo do desenvolvimento de novos insumos para a produção de formulações cosméticas, farmacêuticas e nutracêuticas. Mais particularmente, a presente invenção define um novo processo para obter um extrato de urucum. O processo permite de 20% a 30% maior produção de extrato de urucum em comparação com a extração usando solventes simples e o faz pelo menos 5 vezes mais rapidamente. Além disso, ressalta-se que a etapa inovadora de pré-tratar as sementes por meio da pulverização com biossurfactante promove a produção de um extrato de urucum de alta qualidade, adequado para a produção de diferentes insumos para a preparação de diversas formulações.”

47. Patente US 2019127411 A1 (KERR et al., 2019) Biossurfactantes glicolipopeptídeos. “Surfactantes baseados numa classe de compostos recentemente descoberta incluem um oligômero lipídico hidrofóbico covalentemente ligado a um peptídeo ou cadeia semelhante a peptídeo e um poro hidrato de carbono e um dipeptídeo de serina-

leucinol ligado ao oligômero lipídico. Tais agentes tensoativos podem ser utilizados para criar uma emulsão de óleo em água ou de água em óleo misturando um componente polar; um componente não polar; e o surfactante. Os biossurfactantes da classe recém-descoberta podem ser feitos isolando e cultivando um microrganismo que produz o biossurfactante e, em seguida, isolando o biossurfactante da cultura. Um microrganismo pode ser modificado para produzir biossurfactante desta classe recém-descoberta, expressando um conjunto de genes heterólogos envolvidos na biossíntese do biossurfactante no microrganismo.”

48. Patente US 2019031945 A1 (GUO et al., 2019) Surfactante que altera a molhabilidade do arenito impermeável e seu método de preparação e aplicação. “Um surfactante que altera a molhabilidade do arenito impermeável e seu método de preparação e aplicação. O agente tensoativo da presente invenção pode reduzir a tensão interfacial óleo-água, transformar a superfície molhada de óleo numa superfície molhada de água, o que reduz a adesão de gotículas de óleo à superfície da rocha e melhora a fluidez do óleo bruto no estrato original; melhora a recuperação do reservatório de baixa permeabilidade.”

49. As patentes pesquisadas não fazem menção específica quanto ao uso de biossurfactante produzido pela espécie de levedura proposta (*Saccharomyces cerevisiae*) em alimentos, que é o foco da patente solicitada, combinado ainda com a otimização da formulação de meio para a produção de biossurfactante constituído apenas por resíduos de óleo residual de fritura de soja (fonte de carbono) e milhocina (fonte de nitrogênio), com o método para isolamento otimizado e com sua aplicação em formulação de biscoitos. Isto reforça e demonstra que a patente solicitada é inédita e exclusiva uma vez que são escassas patentes do uso de biossurfactante na área de alimentos.

→ Objetivo da invenção e solução do problema

50. A presente descoberta tem como objetivo oferecer uma alternativa de substituição de compostos sintéticos frente ao desenvolvimento de um novo ingrediente com potencial emulsificante. Além disso, sua propriedade emulsificante está aliada ao poder estabilizante da emulsão uma vez que, em se tratando de alimentos, a estabilidade e vida de prateleira do produto (*shelf life*) é levada em consideração para aquisição pelo consumidor.

51. O biossurfactante descrito apresenta estabilidade térmica e atividade antioxidante. Tais fatores são de extrema importância visto que estão diretamente relacionados com as tecnologias de produção de alimentos, cada vez mais modernas e inovadoras.

→ Descrição detalhada do invento

52. Na presente invenção, um novo biossurfactante produzido por espécie de *Saccharomyces cerevisiae* é utilizado para aplicação em alimentos. O novo processo de produção utiliza água destilada suplementada apenas com óleo vegetal de soja residual, coletado em estabelecimentos comerciais da região metropolitana do Recife, e milhocina, obtido a partir da doação por indústrias locais. O processo é realizado em quatro etapas: preparo do inóculo, formulação do meio de produção, produção do biossurfactante e criação de um novo método de isolamento mais eficiente.

53. Na primeira etapa, o inóculo é feito com a espécie de levedura selecionada (*Saccharomyces cerevisiae*), mantida em meio Yeast Mold Agar (YMA) composto por: extrato de malte- 3g/L, extrato de levedura- 3g/L, peptona- 5g/L, glicose- 10g/L, Agar- 20 g/L) e quando excluído o ágar constitui o meio do pré-inóculo YMB (Yeast Mold Broth), ambos com pH final 5,7. Para obtenção do pré-inóculo a

levedura *Saccharomyces cerevisiae* é transferida para frascos de Erlenmeyer contendo meio líquido Yeast Mold Broth (YMB) e incubada em Shaker orbital a 28 °C, durante 24 horas.

54. Na segunda etapa, o meio de produção é feito com água destilada suplementada com óleo vegetal após fritura, como fonte de carbono e milhocina, utilizada como fonte de nitrogênio. Em seguida, o meio de produção é esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos.

55. Na terceira etapa, a produção é realizada em recipientes contendo uma suspensão da levedura de 10^8 células/mL do pré-inóculo e 500 mL do meio de produção, incubados a 150 rpm em Shaker orbital a 28 °C, durante 120 horas.

56. Na quarta etapa, o biossurfactante presente no meio é isolado por um novo método, adicionando-se 1 volume de acetato de etila para 4 volumes do meio não centrifugado e realizando-se a extração líquido-líquido por duas vezes, sendo a fase orgânica submetida à centrifugação (2600xg por 20 minutos) e posterior filtração. O filtrado é transferido novamente para o funil de separação e solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) é adicionada para separar a fase aquosa restante. A fase orgânica é transferida para um frasco de erlenmeyer, sendo adicionado sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) para secagem, filtrada em papel de filtro qualitativo e seca à temperatura de 50 °C.

57. Após isolamento do biossurfactante e comprovada sua estabilidade térmica e atividade antioxidante, o mesmo é testado em uma formulação de biscoito substituindo parcialmente e totalmente a gema de ovo pasteurizada, nas concentrações de 2% e 4% (peso/volume) para avaliação do melhor perfil de textura. Com a substituição da gema pelo biossurfactante, obteve-se maior firmeza e coesividade e menor elasticidade com a substituição parcial (2% de biossurfactante), resultando em um biscoito mais crocante e mastigável.

58. A Figura 1 apresenta a etapa de produção do biossurfactante a partir de meio composto por resíduos agroindustriais em frascos de Erlenmeyer, seguida da otimização do isolamento do biossurfactante obtido com a melhor condição de cultivo.

59. A Figura 2 representa o biossurfactante extraído do líquido metabólico (isolado) sendo avaliado pelas tensões superficial e interfacial, índice de emulsificação, análise térmica e atividade antioxidante. Após comprovação da capacidade de emulsificação e estabilidade térmica, o produto foi empregado na formulação de biscoito tipo cookie substituindo parcialmente e totalmente a gema do ovo pasteurizada. Desta forma, pode-se comprovar que o uso do biossurfactante confere propriedade emulsificante e ainda pode ser utilizado como um componente de formulação alimentícia comercial.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Processo de obtenção de um novo bioemulsificante, **caracterizado por** ser produzido por levedura, a partir de meio de produção constituído por apenas dois resíduos agroindustriais.
- 2) Produto, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado pelo** uso do líquido metabólico livre de células de *Saccharomyces cerevisiae* para uso como bioemulsificante de óleos vegetais.
- 3) Produto, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado pela** análise térmica de estabilidade.
- 4) Produto, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado pela** análise de atividade antioxidante.
- 5) Produto, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado pelo** uso do bioemulsificante líquido, para uso como constituinte de biscoitos.

FIGURAS

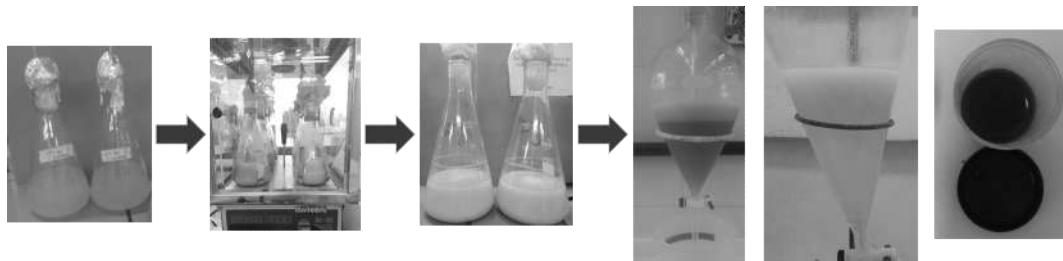


Figura 1

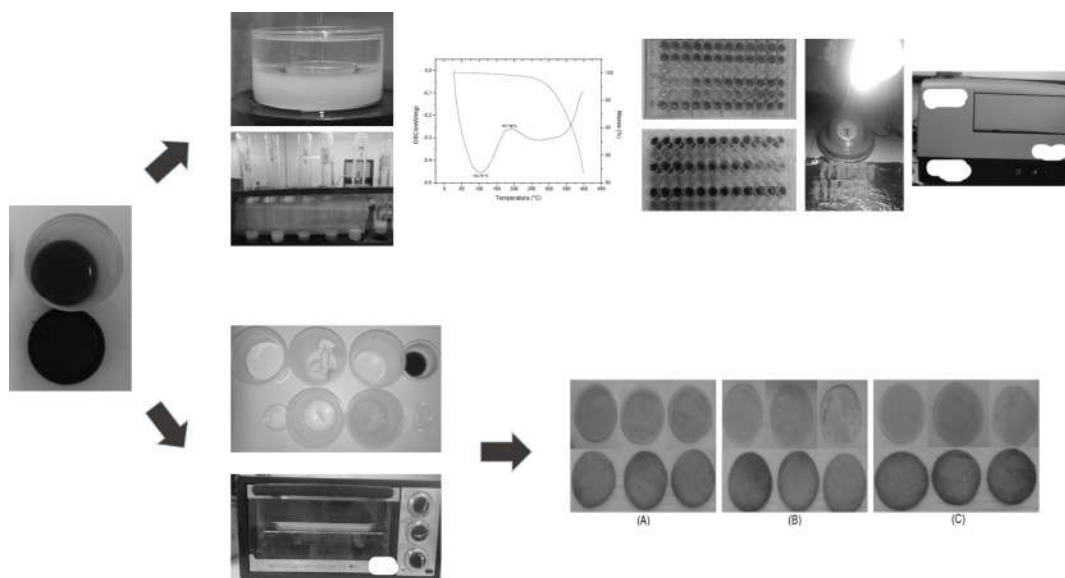


Figura 2

RESUMO

BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Saccharomyces cerevisiae* PARA APLICAÇÃO COMO EMULSIFICANTE ALIMENTÍCIO

A utilização dos biossurfactantes desperta grande interesse industrial em função da diversidade de estruturas e produção a partir de fontes renováveis, obtendo produtos resistentes às técnicas de processamento utilizadas nas indústrias. O biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae* foi produzido em meio contendo óleo de fritura de soja e milhocina, mantido a 28°C a 150rpm por 120h. O biossurfactante isolado por método otimizado foi caracterizado como glicolipídio, apresentando em sua composição 80,0% de lipídios e 19,6% de carboidratos, com característica molecular de éster. Apresentou emulsões estáveis em três diferentes concentrações frente óleos vegetais, estabilidade térmica até 320°C e atividade antioxidante frente dois ensaios distintos, parâmetros importantes para utilização na indústria alimentícia. O biossurfactante produziu boas formulações de biscoitos substituindo-se parcialmente e totalmente a gema do ovo pasteurizada da formulação original, com melhorias no perfil de textura da massa antes e após cocção. Desta forma, o biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae* apresentou boa estabilidade e aplicabilidade como componente de formulação de biscoitos.