



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

(21) BR 102020026212-2 A2



(22) Data do Depósito: 21/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 28/06/2022

(54) **Título:** BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE TRAUSTOQUITRÍDEO RICA EM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E BIOPRODUTO COMPOSTO DE BIOMASSA DE TRAUSTOQUITRÍDEO

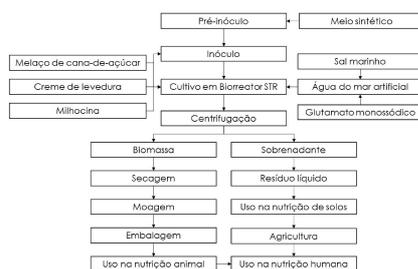
(51) **Int. Cl.:** C12N 1/12; C12P 7/08.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) **Inventor(es):** CARLOS RICARDO SOCCOL; BRIGITTE STHEPANI OROZCO COLONIA; GILBERTO VINICIUS DE MELO PEREIRA; SUSAN GRACE KARP.

(57) **Resumo:** BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE TRAUSTOQUITRÍDEO RICA EM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E BIOPRODUTO COMPOSTO DE BIOMASSA DE TRAUSTOQUITRÍDEO. A presente invenção trata de um bioprocesso tecnológico para produção de biomassa de traustoitritídeo rica em ácido docosahexaenóico (DHA) do tipo ômega-3 em biorreator de tanque agitado por cultivo submerso, e também em um bioproduto composto de biomassa de traustoitritídeo. Este bioprocesso aproveita resíduos agroindustriais gerados pelas indústrias agroalimentares como o melaço de cana-de-açúcar, o creme de levedura e a milhocina como fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultura. O bioprocesso é caracterizado pela produção sustentável, controlada e de baixo custo de biomassa microbiana, um bioproduto que pode ser utilizado na alimentação animal.

Figura 2



**BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE TRAUSTOQUITRÍDEO RICA  
EM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO UTILIZANDO RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS E BIOPRODUTO ENRIQUECIDO COM BIOMASSA DE  
TRAUSTOQUITRÍDEO**

**Campo da Invenção**

[001]. Esta invenção está inserida na área de biotecnologia agroalimentar, especificamente na área de alimentos funcionais e nutracêuticos. A presente invenção consiste no aproveitamento do melaço de cana-de-açúcar, creme de levedura e milhocina na produção de biomassa microbiana rica ácido docosahexaenóico (DHA) do tipo ômega-3 em cultivo submerso pelos traustoqueitrideos marinhos *Aurantiochytrium* spp. Da mesma forma, este bioprocessos facilita a produção sustentável de biomassa em combinação com resíduos agroindustriais brutos visando enriquecer bioproduto final para aplicação na suplementação e alimentação animal.

**Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica**

Melaço de cana-de-açúcar

[002]. O melaço ou mel final é o principal subproduto agroindustrial resultante da etapa de centrifugação na fabricação de açúcar. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e na safra 2019/20 foram produzidas 642.7 milhões de toneladas (CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 7 - Safra 2019/20, n. 2, p. 1-64. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, 2020). Assim, são gerados aproximadamente entre 40 a 60 kg de melaço por tonelada de cana processada. O melaço é uma fonte de carbono de baixo custo e sua principal aplicação é nas usinas de produção de

álcool etílico ou etanol. Também é utilizado como matéria prima na indústria biotecnológica, farmacêutica, química e alimentícia (OLIVEIRA, M. R. B. et al. PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MELAÇO DE CANA. Revista de Estudos Ambientais, v. 21, n. 1, p. 38, 10 out. 2019).

[003]. O melaço é um líquido viscoso marrom rico em açúcares com pH entre 5.7 e 5.9. A glicose e a frutose são açúcares redutores, já o dissacarídeo sacarose precisa ser hidrolisado em glicose e frutose (Tabela 1). Os açúcares redutores totais (ART) do melaço de cana compreendem entre 54 e 59.2% em termos de glicose e frutose. Estes açúcares fermentescíveis podem ser utilizados por microrganismos para promover o crescimento celular, motivo pelo qual é amplamente utilizado por leveduras para produção de etanol.

Tabela 1 – Composição centesimal química aproximada do melaço de cana-de-açúcar (MELAÇOS BRASILEIROS. Especificações técnicas do melaço de cana líquido. Disponível em: <https://melacos.com.br/especificacoes-tecnicas>).

<b>Composição</b>	<b>Melaço de cana (% em base seca)</b>
Matéria seca	79.5-81.6%
Matéria orgânica	74%
Proteínas	3-3.2%
Carboidratos	54-59.2%
Sacarose	39.4-39.9%
Glicose	5.3-6.9%
Frutose	7.6-7.9%
Cinzas	8.7-11%

#### Creme de levedura

[004]. O creme ou leite de levedura é um subproduto agroindustrial gerado principalmente da produção biotecnológica de etanol no setor sucroalcooleiro e também na produção de cerveja. A fermentação alcoólica utiliza levedura ou fermento para transformar o açúcar do mosto em etanol e gás carbônico. As leveduras comumente

utilizadas são da família *Saccharomyces cerevisiae*. Após a fermentação terminar, as células das leveduras são decantadas naturalmente, onde cerca de 75-85% apresentam viabilidade celular podendo ser reutilizadas em próximas fermentações. Dessa forma, aproximadamente 20% das leveduras restantes compõem o subproduto conhecido como creme ou leite de levedura. A levedura pode ser ainda inserida em um processo de fermentação endógena e submetida a estresse, o que ocasiona o consumo das próprias reservas de carboidratos aumentando conseqüentemente o conteúdo de proteína celular. Assim, o creme de levedura entra em um processo de lavagem e desalcoholização, em seguida é destinado à secagem por atomização (*spray-dryer*) com ar quente produzindo a levedura inativa seca (SANTOS, M. M. Leveduras de cerveja e cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*), autolisada e íntegra, na dieta de cães. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2009).

[005]. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, seguido dos EUA, e na safra 2019/20 foram produzidos 34 bilhões de litros de etanol a partir da cana-de-açúcar (CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 7 - Safra 2019/20, n. 2, p. 1-64. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, 2020). Assim, são gerados entre 2.5 e 3 kg de levedura seca para 100 litros de álcool produzido. A levedura seca de cana é utilizada na alimentação animal, já a levedura seca de cerveja é utilizada como suplemento nutricional na alimentação humana. As aplicações são devidas principalmente ao seu alto conteúdo protéico variando entre 33 e 50% (Tabela 2), representando entre 70 e 85% de caseína. Os carboidratos presentes no creme de levedura são representados principalmente por trealose, glucanos, mananoligossacarídeos (MOS) e glicogênio (DURAN, D. S.; PEIXOTO, T. B. Viabilidade Econômica da Implantação do Sistema de

Secagem – *Spray Dry* – para Levedura em Usina na região Centro-Sul do Brasil. Em: *Temas do Agronegócio*, p. 153-178, Piracicaba, 2015).

Tabela 1 – Composição centesimal química aproximada do creme de levedura (CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, n. 2, p. 102–106, ago. 1997.), (MATHIAS, T. R. DOS S. et al. Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 121, n. 3, p. 400–404, jul. 2015.) e (POVEDA PARRA, A. R. et al. Levedura mista (cerveja + cana-de-açúcar) spray-dry na alimentação de leitões na fase inicial. *Archivos de Zootecnia*, v. 62, n. 238, p. 199–209, jun. 2013.).

<b>Composição</b>	<b>Crema de levedura (% em base seca)</b>
Matéria seca	10-20%
Matéria orgânica	80-90%
Proteínas	33.6-49.8%
Carboidratos	26-45%
Lipídeos	3.0-4.9%
Fibras	9-9.5%
Cinzas	5.9-8.3%

### Milhocina

[006]. A milhocina ou água de maceração do milho é um subproduto agroindustrial de cor marrom claro a escuro, odor ensilado e pH baixo (3.7-3.86) devido ao alto teor de ácido láctico. A milhocina é obtida na moagem por via úmida no processamento do milho, onde os grãos do milho são embebidos em água aquecida enquanto são macerados sucessivamente. Assim, a água de maceração pode ser evaporada até obter cerca de 45 a 50% de sólidos ou matéria seca (BUYONDO, J. P.; JAQUESS, P. Method to enhance yeast growth for fermentative bioproduct production, and nutrient composition for same. WO 2017/070200 A1, 2017).

[007]. A milhocina apresenta uma composição variável dependendo da condição, origem e qualidade do milho e do processamento (Tabela 3). Este resíduo agroindustrial de baixo custo é uma excelente fonte de nitrogênio, proteínas, aminoácidos, carboidratos não fibrosos, vitaminas e minerais. Entre os principais aminoácidos destacam-se a alanina, valina e leucina. Os carboidratos não fibrosos incluem o ácido lático (20-28% em base seca), amido (14.8% em base seca) e açúcares redutores em baixa concentração (2.0-3.0% em base seca). A milhocina pode ser utilizada na alimentação animal e recentemente como substituta do extrato de levedura no meio de cultura de processos fermentativos contribuindo no metabolismo celular de microrganismos (PEREIRA, M. D. G. Influência dos resíduos agroindustriais (milhocina e farinha de banana verde) na produção de carboidratos totais, quitosana e lipídios por *Cunninghamella echinulata* UCP 1297. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2013).

Tabela 3 – Composição centesimal química aproximada da milhocina (CHOVATIYA, S. G.; BHATT, S. S.; SHAH, A. R. Evaluation of corn steep liquor as a supplementary feed for *Labeo rohita* (Ham.) fingerlings. *Aquaculture International*, v. 19, n. 1, p. 1–12, 20 fev. 2011), (ECKERLE, G. J. et al. Effects of corn steep liquor supplementation on voluntary selection of tallgrass prairie hay contaminated with sericea lespedeza and uncontaminated tallgrass prairie hay. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, n. 1, p. 58–61, 1 jan. 2012), (MAHR-UN-NISA et al. Influence of Corn Steep Liquor on Feeding Value of Urea Treated Wheat Straw in Buffaloes Fed at Restricted Diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 19, n. 11, p. 1610–1616, 29 set. 2006) e (SANTOS, V. L. F. DOS et al. Protein sources for crossbred dairy cows in the semiarid. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, n. 10, p. 2272–2278, out. 2012).

<b>Composição</b>	<b>Milhocina (% em base seca)</b>
Matéria seca	45.1-52.0
Matéria orgânica	89.8-95.1
Proteínas	31.6-49.0%

Carboidratos	23.55-46.7
Lipídeos	0.10-1.25
Fibras	0.5-0.6
Cinzas	8.44-10.30

#### AGPI-CL n-3 e o ácido docosahexaenóico (DHA)

[008]. Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega-3 (AGPI-CL n-3) são ácidos carboxílicos essenciais, já que não são sintetizados eficientemente pelo homem ou pelos animais, sendo necessária sua ingestão na dieta. Os AGPI-CL n-3 são encontrados principalmente de fontes marinhas como o peixe, frutos do mar e recentemente microrganismos como as microalgas. Estes compreendem três ácidos graxos principais tais como o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 n-3), o ácido docosapentaenóico (DPA, C22:5 n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 n-3). Este último, o ácido docosahexaenóico (DHA) é produzido na biossíntese final de lipídeos no metabolismo de microalgas heterotróficas ou traustocitrídeos com ajuda de um conjunto de enzimas. Os animais do mundo marinho como peixes e frutos do mar se alimentam naturalmente dessas microalgas ricas em DHA/ômega-3, o que facilita posteriormente o consumo direto de DHA pelos humanos (SAINI, R. K.; KEUM, Y.-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, v. 203, p. 255–267, 2018).

[009]. Os AGPI-CL n-3 trazem grandes benefícios à saúde do coração, crescimento e desenvolvimento do cérebro, manutenção das funções cerebrais, desenvolvimento fetal e visão em crianças. Além disso, o DHA/ômega ajuda na melhora da memória e na diminuição dos níveis de colesterol ruim (LDL) no sangue (MALLICK, R.; BASAK, S.; DUTTARROY, A. K. Docosahexaenoic acid, 22:6n-3: Its roles in the structure and function of the brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 79, p.

21–31, 2019) e (MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Y. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 58, n. 20, p. 2047–2067, 2011).

### Traustoquitrídeos marinhos

[010]. Os traustoquitrídeos são protistas marinhos também conhecidos como microalgas heterotróficas, que podem crescer em sistemas controlados com a capacidade de acumular mais de 50% da sua biomassa como lipídios intracelulares, onde os ácidos graxos ômega-3 equivalem a mais do 25% desses lipídeos. Eles pertencem à classe dos Labirintulomicetos, os quais possuem principalmente espécies microbianas que produzem ácidos graxos ômega-3. Os gêneros microbianos dos labirintulomicetos incluem *Aplanochytrium*, *Labyrinthuloides*, *Stellarchytrium*, *Labyrinthula*, *Oblongichytrium*, *Thraustochytrium*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Ulkenia*, *Sicyoidochytrium*, *Parietichytrium*, *Botryochytrium*, *Monorhizochytrium*, *Labyrinthulochytrium* (FOSSIER MARCHAN, L. et al. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: A review. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 1, p. 26–46, 2018).

[011]. Os traustoquitrídeos tem chamado a atenção pela grande produção de diversos metabólitos tais como enzimas, carotenoides (caroteno, astaxantina, cantaxantina), antioxidantes, esteróis (esqualeno) e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega-3 (AGPI-CL n-3) como o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 n-3). (MORABITO, C. et al. The lipid metabolism in thraustochytrids. *Progress in Lipid Research*, v. 76, p. 101007, 2019).

### Biomassa de traustocitrídeos na nutrição animal

[012]. Os animais não são capazes de sintetizar eficientemente ômega-3 em seu metabolismo, razão pela qual é necessário seu consumo em dietas. As microalgas como os traustocitrídeos são os produtores primários de ômega-3 no ambiente marinho, e os peixes contêm ômega-3 porque consomem em grande parte outros peixes ou zooplâncton que se alimentaram desses traustocitrídeos (VENTURA, S.P. et al. Extraction of value-added compounds from microalgae. In: Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts. [s.l.] Elsevier, p. 461–483, 2017).

[013]. A biomassa de traustocitrídeos rica em ômega-3 pode ser usada para nutrição humana e animal, incluindo alimentos e bebidas fortificados, suplementos dietéticos, fórmulas infantis, nutrição clínica e alimentos médicos, produtos farmacêuticos e alimentos para animais de estimação (ROBERTSON, R. et al. Algae-Derived Polyunsaturated Fatty Acids: Implications for Human Health. In: CATALÁ, A. (Ed.). Polyunsaturated fatty acids sources, antioxidant properties and health Benefits. [s.l.] Nova Publishers, p. 54, 2013).

[014]. Diversas pesquisas da inclusão ou suplementação de ômega-3 de traustocitrídeos na alimentação de peixes, aves e bovinos buscam aumentar os níveis nutricionais desses ácidos graxos. Por exemplo, a inclusão de 40 g de *Schizochytrium* sp. para cada 1 kg de ração na alimentação de tilápia-do-Nilo teve efeitos positivos no ganho de peso (de 1.3 g para 7.5 g), no aumento proteico, e no incremento nos níveis de ômega-3 (de 1.8% para 5.2%) e ácido docosahexaenóico (DHA) (de 0.6% para 3.9%) quando comparado ao controle sem adição de *Schizochytrium* sp. (DOS SANTOS, S. K. A. et al. Evaluation of growth and fatty acid profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with *Schizochytrium* sp. Aquaculture Research, v. 50, n. 4, p. 1068–1074, 2019).

[015]. Por exemplo, um estudo comparativo utilizando óleo de peixe e 5% de inclusão de biomassa de *Aurantiochytrium* sp. TC 20 em dietas de salmão do Atlântico apresentou performance similares quanto ao ganho de peso, composição bromatológica e perfil lipídico. Os ácidos graxos poli-insaturados no peso final do salmão foram 29.9 mg/g na dieta com óleo de atum e 28.6 mg/g na dieta com traustoquitrídeo. A quantidade de ácido docosahexaenóico (DHA) no peso final foi 15.1 mg/g na dieta com óleo de atum e 13.2 mg/g na dieta com biomassa de traustoquitrídeo. Estes resultados mostraram o potencial biotecnológico da biomassa de *Aurantiochytrium* sp. TC 20 como substituto do óleo de peixe na alimentação de salmão (LEE CHANG, K. J. et al. Feeding Whole Thraustochytrid Biomass to Cultured Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fingerlings: Culture Performance and Fatty Acid Incorporation. *Journal of Marine Science and Engineering*, v. 8, n. 3, p. 207, 2020).

[016]. Por exemplo, efeitos da adição de níveis graduais de entre 1 e 3% de biomassa comercial de microalgas *Schizochytrium limacinum* CCAP 4087/2 (All-G-Rich™, Alltech Inc.) em dietas de galinhas mostrou um aumento no teor de ácido docosahexaenóico (DHA) na gema do ovo de 248 para 776 mg de DHA por 100 g de gema de ovo com 3% de inclusão (AO, T. et al. Effects of supplementing microalgae in laying hen diets on productive performance, fatty-acid profile, and oxidative stability of eggs. *The Journal of Applied Poultry Research*, v. 24, n. 3, p. 394–400, 2015).

[017]. Não foi encontrado nenhum bioprocesso ou bioproduto similares aos da presente invenção no estado da técnica e no mercado. A busca de anterioridade revelou patentes (WO2007074479A1; WO2005045050A1; US2006188969A1; CA2072978A1) que apresentam a produção de lipídeos por cepa mutante ou não de

*Schizochytrium* podendo suplementar milhocina no meio sintético. A patente CN104561151B apresenta etapas de pré-tratamento (acidificação, floculação, etc.) do melaço de cana para fermentação de DHA por *Schizochytrium*. No entanto, nenhuma patente demonstrou o desenvolvimento de um bioprocesso integrado utilizando os resíduos melaço de cana, milhocina e creme de levedura como meio de cultura principal na produção de biomassa enriquecida com DHA/ômega-3. Os bancos de dados e patentes Patent Inspiration, INPI, Derwent e Google Patents foram utilizados no levantamento.

### **Descrição da abordagem do problema técnico**

[018]. As agroindústrias e as indústrias agroalimentares geram uma quantidade significativa de resíduos líquidos e sólidos. Estes resíduos, quando não tratados, podem ocasionar grandes problemas ambientais, econômicos e sociais. Porém, o aproveitamento deles na geração de novos produtos permite viabilizar esses resíduos, buscando assim diminuir os desperdícios industriais e converter esses resíduos em subprodutos ou matérias primas com valor econômico. Resíduos como o melaço de cana-de-açúcar, a milhocina e o creme de levedura aparecem como uma alternativa de substratos de baixo custo para a produção de biomassa de traustoquitrídeos. Estes substratos atuam como fonte de nitrogênio devido ao alto conteúdo de proteína presente no creme de levedura e milhocina favorecendo o crescimento e desenvolvimento celular da biomassa. Já o melaço de cana atua como principal fonte de carbono e seu alto teor de açúcares contribui na transformação e acúmulo de lipídeos na célula, sendo de alto valor nutricional como é o ácido docosahexaenóico (DHA/ômega-3).

[019]. Diversas organizações mundiais como a OMS (Organização Mundial de Saúde), a FAO (Organização de Alimentos e

Agricultura dos Estados Unidos), a ISSFAL (Sociedade Internacional para Estudo dos Ácidos Graxos e Lipídios), a WAPM (Associação Mundial de Medicina Perinatal) e a GOED (Organização Global para EPA e DHA Ômega-3) têm estabelecido recomendações de ingestão diária de ômega-3 (DHA e EPA) de acordo com evidências científicas. Da mesma forma, cada país tem suas recomendações de ingestão diária estabelecidas por organizações nacionais como é o caso da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e a Associação Brasileira de Nutrologia (ABRAN). Esses valores variam entre 10-150 mg/dia para crianças, entre 200-500 mg/dia para adultos saudáveis, entre 200-300 mg/dia para grávidas e lactantes e entre 500-1000 mg/dia para pessoas com doenças cardíacas, hipertensão e triglicérides altos no sangue (ISSFAL. International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. Global Recommendations for EPA and DHA Intake. Rev 19 November 2014. Disponível em: <https://www.issfal.org/goed-recommendations-for-epa-dha>).

[020]. Tradicionalmente, o óleo de peixe e a farinha de peixe têm sido as fontes tradicionais de ácidos graxos ômega-3 na alimentação humana e animal. Porém, esta fonte tem sido questionada devido ao risco de contaminantes, poluentes e a pesca extrativista. Essa fonte exclusiva de biolipídeos não tem conseguido sustentar a demanda global por esse tipo de produto, necessitando aumentar cada vez mais os níveis de predação dos mares. A pesca extrativista tem gerado problemas econômicos, éticos e ambientais; a qual ocorre a uma velocidade tão rápida que o oceano não consegue substituir as espécies marinhas a tempo, o que leva à sua extinção e escassez (KAR, T.; MATSUDA, H. An overview of bioeconomic analysis and management in fisheries. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, v. 1, n. 3, p. 218–234, 2006).

[021]. Objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) ou *United Nations Sustainable Development Goals (SDGs)* foram adotados pela Organização das Nações Unidas (ONU) e buscam ser atingidos até o ano 2030 (UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME. The Sustainable Development Goals (SDGs). Disponível em: <https://www.br.undp.org/content/brazil/pt/home/sustainable-development-goals.html>). Alguns desses objetivos podem ser alcançados com o uso de traustoquitrídeos como fonte de ômega-3 na alimentação humana e animal. Esta fonte atende ao objetivo Nº 2 (Fome zero), o qual busca acabar com a fome e a má-nutrição. Igualmente contribui para o objetivo Nº 3 (Saúde e bem estar) melhorando a saúde materna e o sistema imunológico, e reduzindo a mortalidade infantil. Assim, o objetivo Nº 14 (Vida na água) também é atendido, o qual busca reduzir a poluição marinha, garantir a proteção dos ecossistemas marinhos e costeiros, diminuir a pesca extrativista e incentivar práticas sustentáveis como a aquacultura. Portanto, faz-se necessária a busca por fontes alternativas (como via biotecnológica microbiana) de produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega-3 (AGPI-CL n-3).

[022]. A biomassa de traustoquitrídeos tem aparecido como uma alternativa sustentável e renovável. Algumas vantagens do uso de traustoquitrídeos como fonte de ômega-3 são: Os traustoquitrídeos não são patogênicos ou tóxicos, são uma fonte sustentável de baixo custo, podem crescer em condições de fermentação controladas, são uma fonte vegetariana ou vegana, podem ser consumidos por pessoas com alergia a peixes ou frutos do mar, são menos suscetíveis à contaminação ambiental por produtos químicos, possuem estabilidade oxidativa, não são necessárias modificações genéticas para obter altos rendimentos (OROZCO COLONIA, B. S.; VINÍCIUS DE MELO PEREIRA, G.; SOCCOL, C. R. Omega-3 microbial oils from marine thraustochytrids as a sustainable and

technological solution: A review and patent landscape. Trends in Food Science & Technology, v. 99, p. 244–256, 2020). Além disso, a quantidade de ômega-3 extraída a partir dos traustoquitrídeos é superior à extraída de peixes e plantas, sendo 30 kg de ômega-3 por tonelada de peixe, 49 kg de ômega-3 por tonelada de plantas e 300 kg de ômega-3 por tonelada de biomassa de traustoquitrídeos (FINCO, A. M. DE O. et al. Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. Critical Reviews in Biotechnology, v. 37, n. 5, p. 656–671, 20170).

### **Descrição detalhada da Invenção**

[023]. A presente invenção consiste em um bioprocesso de produção de biomassa de traustoquitrídeo rica em ácido docosahexaenóico utilizando resíduos agroindustriais brutos, caracterizado por utilizar melaço de cana-de-açúcar na faixa de 80 a 100 g/L, creme de levedura na faixa de 10 a 20 g/L e milhocina na faixa de 20 a 30 g/L como substratos do meio de cultivo, e também água do mar artificial composta de sal marinho na faixa de 10 a 20 g/L e glutamato monossódico na faixa de 2 a 5 g/L. O processo emprega traustoquitrídeos marinhos *Aurantiochytrium* spp. como inóculo.

[024]. O bioprocesso deve ser conduzido em cultivo submerso em biorreator de tanque agitado durante 72 a 120 horas, com taxa de inóculo entre 9 e 11% (v/v), aeração entre 0.5 e 1 vvm, pH entre 5.5 e 6.0, agitação entre 400 e 800 rpm e temperatura entre 25 e 28 °C.

[025]. Como resultado, obtém-se biomassa microbiana rica em ácido docosahexaenóico (DHA) pertencente à família dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega-3 (AGPI-CL n-3). Mais especificamente, obtém-se entre 39.29 e 40.0 g/L de biomassa e 16.1 e

14.98 g/L de lipídeos, com rendimentos de 0.64 g de biomassa por g de substrato e 0.29 g de lipídeos por g de substrato.

[026]. Após o cultivo submerso, realiza-se a separação da biomassa celular por centrifugação a 4500-5500 g e entre 4 e 10 °C durante 6 a 10 min, a secagem da biomassa em bandejas em estufa com circulação de ar entre 40 e 50 °C durante 24 a 48 horas e a posterior moagem para redução da granulometria para valores entre 0.500mm e 0.354mm.

[027]. O bioproduto enriquecido com biomassa de traustoqueitriídeo é caracterizada por conter, em massa, entre 75 e 90% de biomassa de traustoqueitriídeo e entre 25 e 10% de sólidos dos resíduos brutos de melaço de cana-de-açúcar, milhocina e creme de levedura, resultando em composição que contém entre 87.5 e 85.0% de matéria seca, entre 31.4 e 30.1% de proteína, entre 40.0 e 38.13% de lipídeos, entre 10.1 e 8.17% de carboidratos e entre 10.2 e 9.8% de cinzas. O bioproduto contém ainda entre 35.43 e 30.5% de ácido docosahexaenóico (DHA) e pode ser utilizado na alimentação animal.

### Exemplo de concretização da invenção

#### Pré-inóculo

[028]. O microrganismo é um traustoqueitriídeo que pertence ao gênero *Aurantiochytrium* sp. A cepa encontra-se crio-preservada em glicerol 20% no Centro de Biotecnologia Agroindustrial e Agroalimentar do Paraná (CENBAPAR) localizado no Prédio do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (PPGEBB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

[029]. O pré-inóculo foi preparado em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 70 mL de caldo sintético (50 g/L de glicose, 2 g/L de

peptona, 5 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de sal marinho) e pH 6.0. Os frascos foram inoculados e incubados sob agitação a 120 rpm e 25 °C durante 24 horas.

### Inóculo

[030]. O inóculo foi preparado em frasco Erlenmeyer de 2000 mL contendo 630 mL de meio de cultura à base de água do mar artificial preparada pela adição de 10 g/L de sal marinho. Os resíduos agroindustriais foram adicionados ao meio (50 g/L de melaço de cana-de-açúcar, 10 g/L de milhocina e 2 g/L creme de levedura) e o pH foi ajustado para 6.0.

[031]. Os 70 mL do pré-inóculo (equivalentes a uma taxa de 10%) foram adicionados ao meio de cultura para produção do inóculo. Os frascos foram incubados sob agitação a 120 rpm e 28 °C durante 48 horas.

### Produção em biorreator de tanque agitado STR

[032]. O cultivo submerso foi desenvolvido em biorreator do tipo STR (*Stirred tank reactor*) com capacidade de 10 L. O volume de trabalho foi de 7 L com 30% de *headspace*. O meio previamente esterilizado foi composto por 90 g/L de melaço de cana-de-açúcar, 25 g/L de milhocina e 15 g/L de creme de levedura. Da mesma forma, 10 g/L de sal marinho e 2 g/L de glutamato monossódico foram adicionados ao meio de cultura. O meio foi inoculado com 700 mL de inóculo previamente condicionado em meio contendo resíduos agroindustriais. O bioprocessamento foi mantido entre 25 e 28 °C, pH entre 5.5 e 6.0, aeração entre 0.5 e 1 vvm e variações na agitação de 400-800 rpm durante 120 horas. A geração de espuma durante o cultivo foi estabilizada pela adição controlada de antiespumante.

[033]. Amostras de 15 mL foram retiradas do biorreator a cada 12 horas. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação do consumo de substrato (S) e o precipitado foi utilizado para determinação da biomassa (X) e lipídeos (P).

#### Determinação do consumo de substrato (S)

[034]. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) adaptado (MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959). Os sobrenadantes foram diluídos com água destilada com um fator de diluição de 10. O ensaio foi realizado em microtubos de 2 mL, onde foram adicionados 25 µL do sobrenadante diluído e 25 µL do reagente DNS. Os microtubos foram fervidos a 100 °C durante 5 minutos. Seguidamente, os microtubos foram resfriados em banho de gelo e 330 µL de água destilada foi adicionada. Alíquotas de 300 µL foram colocadas em microplacas de 96 poços e a absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas UV por espectrofotometria. As concentrações de açúcares redutores ou substrato (g/L) foram determinadas de acordo com a equação de regressão gerada pela curva padrão de glicose (0.0-5.0 g/L).

#### Determinação da geração de biomassa (X) e lipídeos (P)

[035]. O precipitado amostrado do biorreator após centrifugação foi seco em estufa a 105 °C até o peso constante. A quantidade de biomassa (g/L) produzida durante o bioprocessamento foi determinada por gravimetria. Seguidamente, a biomassa seca foi utilizada para determinação dos lipídeos por método de extração a frio

com solventes previamente adaptados (BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959). Os lipídeos foram extraídos da biomassa seca utilizando uma mistura de clorofórmio, metanol e água em uma proporção de 2:2:1.8. As amostras juntamente com a mistura foram homogeneizadas e centrifugadas para separação das fases. Alíquotas da fase inferior ou orgânica foram secas em estufa a vácuo a 45 °C durante 3 horas. A quantidade de lipídeos (g/L) contidos na biomassa foi determinada por gravimetria.

#### Estudo dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo

[036]. Os estudos cinéticos mostram que a máxima produção de biomassa foi atingida em 120 horas com 39.29 g/L, igualmente com a produção máxima de lipídeos de 14.98 g/L equivalente a 38.13% de lipídeos na biomassa seca. Adicionalmente, o consumo de substrato (medido pelos açúcares redutores presentes nos resíduos agroindustriais) passou de 60.25 g/L no começo do processo fermentativo até atingir 8.25 g/L às 120 horas (Figura 1A).

[037]. A curva logarítmica de crescimento celular permitiu calcular a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{max}$ ) com um valor de 0.03/hora ou 0.63/dia e um tempo de duplicação celular de 26.26 horas ou 1.09 dias (Figura 1B).

[038]. As produtividades volumétricas horárias máxima, total e global de produção de biomassa foram  $\gamma_{xmax} = 0.64$  g/L.h,  $\gamma_{xtotal} = 0.28$  g/L.h e  $\gamma_{xglobal} = 1.94$  g/h. Adicionalmente, as produtividades volumétricas horárias máxima, total e global da produção de lipídeos foram  $\gamma_{pmax} = 0.35$  g/L.g,  $\gamma_{ptotal} = 0.12$  g/L.h e  $\gamma_{pglobal} = 0.87$  g/h. Assim, a velocidade máxima de consumo de substrato ( $Q_{smax}$ ) foi 0.09/h no

tempo de 24 horas de cultivo e a velocidade máxima de formação de produto foi ( $Q_{p_{max}}$ ) 0.02/h no tempo de 60 horas de cultivo (Figura 1C).

[039]. O rendimento global prático do processo da biomassa em relação ao substrato ( $Y_{x/s}$ ) foi 0.64 g de biomassa por g de substrato quando comparado ao rendimento obtido graficamente pela equação da reta de 0.72 g de biomassa por g de substrato. Por outro lado, o rendimento global prático do processo do produto em relação ao substrato ( $Y_{p/s}$ ) foi 0.29 g de lipídeos por g de substrato próximo ao rendimento gráfico de 0.28 g de lipídeos por g de substrato (Figura 1D).

#### Separação e recuperação da biomassa total

[040]. Após término da fermentação (120 horas), o volume total contido no biorreator foi centrifugado a 5000 rpm e 10 °C durante 10 minutos. O precipitado contendo a biomassa foi disposto em bandejas e seco a 45 °C durante aproximadamente 36 horas em estufa com circulação de ar. A biomassa seca foi resfriada à temperatura ambiente. Seguidamente, a biomassa foi moída em moinho de facas e peneirada na peneira de 35 mesh.

#### Avaliação da composição centesimal da biomassa final

[041]. Análises da matéria seca, proteína, lipídeos, carboidratos e cinzas foram realizadas na biomassa produzida. A quantidade de matéria seca foi determinada utilizando uma balança com determinador de umidade. A quantidade de proteína presente na biomassa foi determinada pelo método Kjeldhal (SOUZA, M. A.; DETMANN, E.; FRANCO, M. O.; BATISTA, E. D.; ROCHA, VALADARES, F. S. C.; SALIBA, E. O. S. Collaborative study to evaluate of the crude protein content in feeds using the "Kjeldahl" method. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, Salvador, v. 17, n. 4, p. 696-709, 2016). A quantidade

de lipídeos foi determinada pelo método Bligh & Dyer (BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959). A quantidade de cinzas foi determinada pela incineração da biomassa em mufla (THIEX, N.; NOVOTNY, L.; CRAWFORD, A. Determination of ash in animal feed: AOAC Official Method 942.05 Revisited. *Journal of AOAC International*, v. 95, n. 5, p. 1392-1397, 2012). A determinação do conteúdo de carboidratos pode ser feita por espectrofotometria e cromatografia da biomassa previamente hidrolisada (MORAES, G. D. Comparação de Métodos para Determinação de açúcares redutores e não-redutores. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Trabalho de diplomação, p. 37, 2016).

[042]. A composição centesimal aproximada em base seca da farinha da biomassa do traustocitrídeo *Aurantiochytrium* sp. foi 87.5% de matéria seca composta de 31.4% de proteína, 38.13% de lipídeos, 8.17% de carboidratos e 9.8% de cinzas.

[043]. A composição dos ácidos graxos ômega-3 foi determinada por cromatografia gasosa após transesterificação da biomassa (INDARTI, E. et al. Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 18, n. 2–3, p. 161–170, 2005). Assim, o conteúdo de ômega-3 presente nos lipídeos foi aproximadamente 35.43% de ácido docosaheptaenóico (DHA, 22:6, n-3).

#### Descrição das Figuras

[044]. Figura 1 – Curvas cinéticas do processo fermentativo em biorreator de tanque agitado STR (*Stirred Tank Reactor*) utilizando como substrato melaço de cana-de-açúcar, milhocina e creme de levedura. A) Produção de X: Biomassa (g/L); P: Lipídeos (g/L) e consumo

de S: Substrato (g/L). B) Curva de crescimento celular  $\ln(X)$ : Logaritmo neperiano da biomassa. C)  $Q_s$ : Velocidade de consumo de substrato;  $Q_p$ : Velocidade de formação de produto. D) Evolução do rendimento do processo para  $\Delta X$ : Variação da biomassa em função do tempo,  $\Delta P$ : Variação de Lipídeos em função do tempo e  $\Delta S$ : Variação do substrato em função do tempo.

[045]. Figura 2 – Fluxograma do bioprocesso para produção de biomassa de traustequitrídeos rica em ômega-3 a partir de resíduos agroindustriais (melaço de cana-de-açúcar, milhocina e creme de levedura).

## REIVINDICAÇÕES

1. BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE TRAUSTOQUITRÍDEO RICA EM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, **caracterizado por** utilizar melaço de cana-de-açúcar, creme de levedura e milhocina na sua forma líquida e bruta como substratos do meio de cultivo, água do mar artificial composta de sal marinho e glutamato monossódico e por empregar traustoquitrídeos marinhos *Aurantiochytrium spp.*

2. BIOPROCESSO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** emprego de melaço de cana-de-açúcar bruto na faixa de 80 a 100 g/L, creme de levedura bruto na faixa de 10 a 20 g/L e milhocina bruta na faixa de 20 a 30 g/L, sal marinho na faixa de 10 a 20 g/L e glutamato monossódico na faixa de 2 a 5 g/L.

3. BIOPROCESSO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** realização de cultivo submerso em biorreator de tanque agitado durante 72 a 120 horas, com taxa de inóculo entre 9 e 11% (v/v), aeração entre 0.5 e 1 vvm, pH entre 5.5 e 6.0, agitação entre 400 e 800 rpm e temperatura entre 25 e 28 °C.

4. BIOPROCESSO de acordo com as reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** resultar na produção de biomassa microbiana rica em ácido docosahexaenóico (DHA) pertencente à família dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega-3 (AGPI-CL n-3).

5. BIOPROCESSO de acordo com as reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** resultar na produção de 39.29 a 40.0 g/L de biomassa e 16.1 a 14.98 g/L de lipídeos, com rendimentos de 0.64 g de biomassa por g de substrato e 0.29 g de lipídeos por g de substrato.

6. BIOPROCESSO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** separação da biomassa celular por centrifugação

a 4500-5500 g e entre 4 e 10 °C durante 6 a 10 min, secagem da biomassa em bandejas em estufa com circulação de ar entre 40 e 50 °C durante 24 a 48 horas e posterior moagem para redução da granulometria para valores entre 0.500mm e 0.354mm.

7. BIOPRODUTO ENRIQUECIDO COM BIOMASSA DE TRAUSTOQUITRÍDEO produzido por bioprocesso tal qual descrito nas reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** conter, em massa, entre 75 e 90% de biomassa de traustoquitrídeo e entre 25 e 10% de sólidos dos resíduos brutos de melaço de cana-de-açúcar, milhocina e creme de levedura, resultando em composição que contém entre 35.43 e 30.5% de ácido docosahexaenóico (DHA), entre 87.5 e 85.0% de matéria seca, entre 31.4 e 30.1% de proteína, entre 40.0 e 38.13% de lipídeos, entre 10.1 e 8.17% de carboidratos e entre 10.2 e 9.8% de cinzas, o qual pode ser utilizado na alimentação animal.

FIGURAS

Figura 1

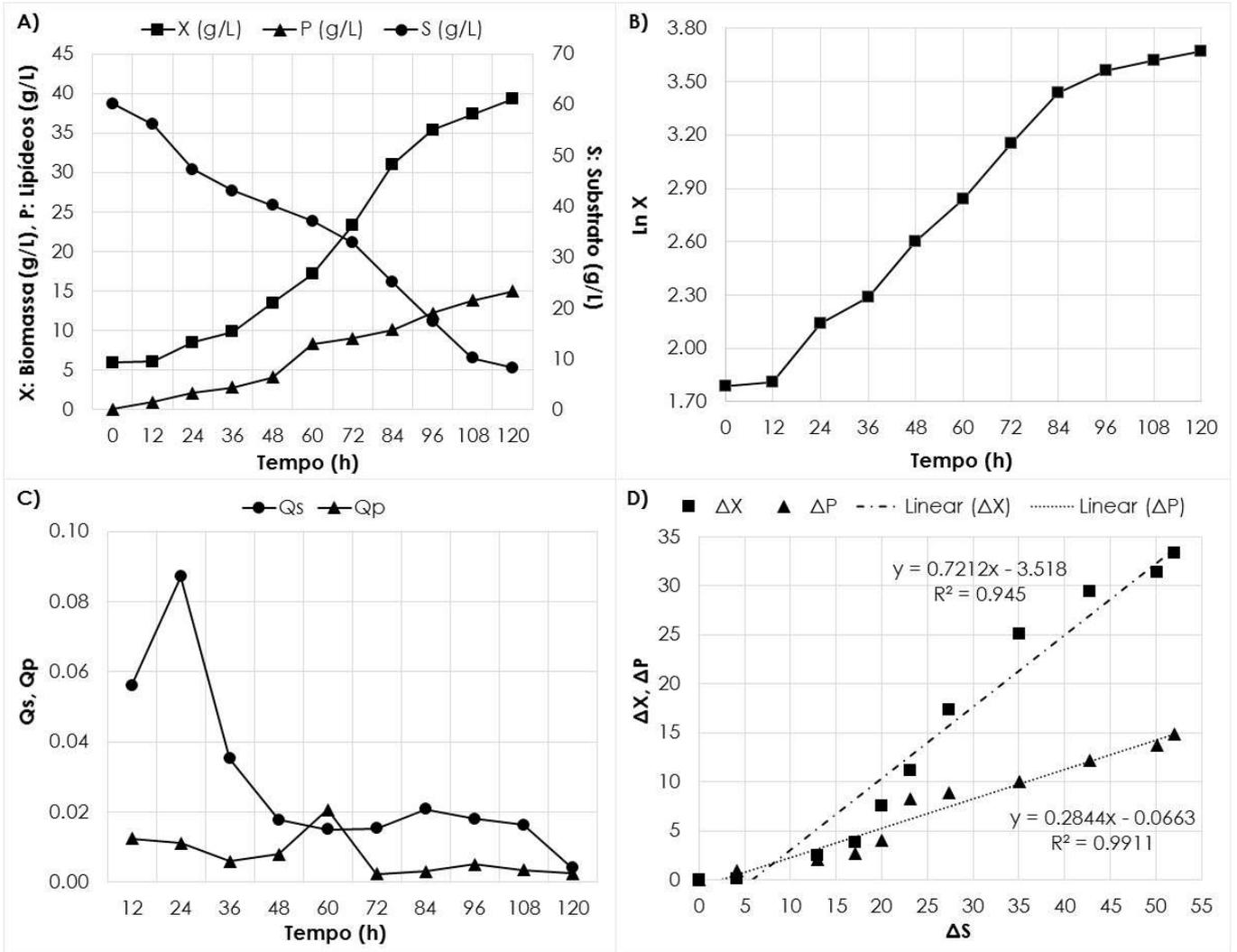
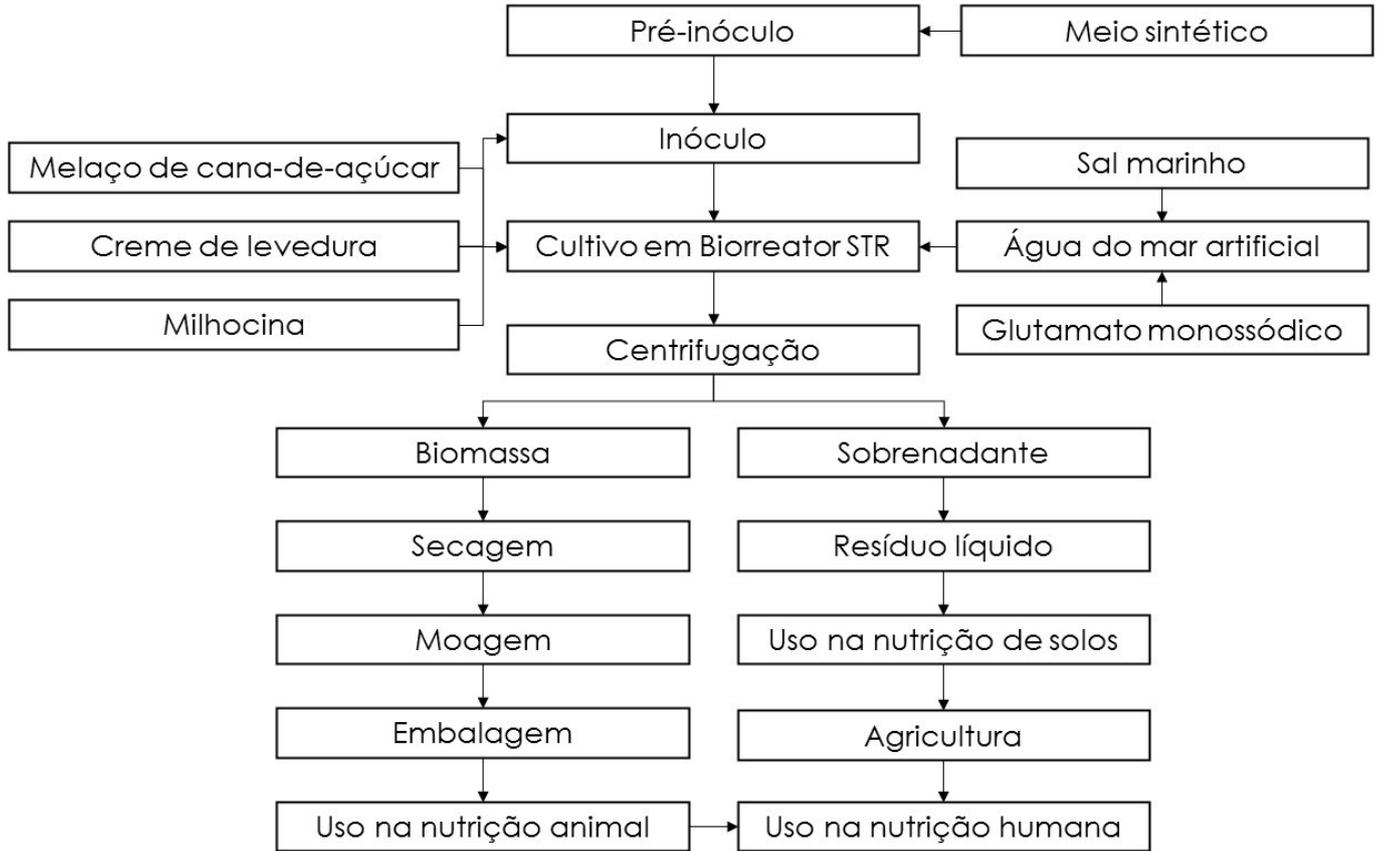


Figura 2



**RESUMO****BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE TRAUSTOQUITRÍDEO RICA EM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E BIOPRODUTO ENRIQUECIDO COM BIOMASSA DE TRAUSTOQUITRÍDEO**

A presente invenção trata de um bioprocesso tecnológico para produção de biomassa de traustoitritrideo rica em ácido docosahexaenóico (DHA) do tipo ômega-3 em biorreator de tanque agitado por cultivo submerso, e também a obtenção de um bioproduto enriquecido com biomassa de traustoitritrideo. Este bioprocesso aproveita resíduos brutos e líquidos gerados pelas indústrias agroalimentares como o melaço de cana-de-açúcar, o creme de levedura e a milhocina como fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultura. O bioprocesso é caracterizado pela produção sustentável, controlada e de baixo custo de biomassa microbiana para enriquecimento de um bioproduto que pode ser utilizado na alimentação animal.