



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102019026462-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102019026462-4

(22) Data do Depósito: 12/12/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 15/06/2021

(51) Classificação Internacional: C12P 1/04; C12N 1/20; C12N 1/22; A61K 35/742; C12R 1/125.

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ADITIVO PROBIÓTICO E COMPOSIÇÃO PROBIÓTICA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2O ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira; INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 10652179000115. Endereço: AV. VICTOR FERREIRA DO AMARAL, 306, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 82530-230, Brasileira; CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLOGICOS, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 76416866004056. Endereço: AV. SÃO ROQUE, 716, Piraquara, PR, BRASIL(BR), 83302-200, Brasileira

(72) Inventor: CARLOS RICARDO SOCCOL; TARCILA BUENO; SANDRA REGINA BARROSO RUIZ SELLA; ANGELO AUGUSTO BUTURI DE OLIVEIRA; SUSAN GRACE KARP.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 12/12/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 31/12/2024

Assinado digitalmente por:
Alexandre Gomes Ciano

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ADITIVO PROBIÓTICO E COMPOSIÇÃO PROBIÓTICA

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção trata de um processo para produção de aditivo probiótico e de uma composição probiótica contendo esporos de *Bacillus subtilis*, aplicável ao setor de nutrição animal.

[002]. O processo de produção consiste em um processo de fermentação em estado sólido (FES) utilizando matérias primas de baixo custo, oriundas das indústrias da soja, milho e culturas sacarinas, que induzem a multiplicação e a esporulação de bactérias *B. subtilis* com alto rendimento. A referida composição resulta diretamente deste processo fermentativo.

[003]. A invenção proposta insere-se no campo de aditivos de uso veterinário que podem ser adicionados, de forma não limitada, a rações e água, com aplicação, porém não limitada, no setor de nutrição animal em geral, incluindo piscicultura, com ênfase ao uso na avicultura industrial moderna, por ser uma alternativa ao uso de antibióticos.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[004]. No Brasil e no mundo observa-se um crescimento na produção pecuária e particularmente na produção de frangos. Este cenário é decorrente de fatores como o crescimento na demanda, alta competição com os demais setores de proteína animal, aumento na produtividade em função do melhoramento genético, nutrição e manejo, e a tendência ao consumo de carnes mais saudáveis.

[005]. Na avicultura industrial moderna, por exemplo, o sistema artificial de produção afeta o desenvolvimento da flora intestinal dos animais de

forma marcante, pela falta de contato com uma microbiota natural. Para contornar esta situação, são utilizados os chamados "promotores de crescimento" que, geralmente, são drogas antibióticas utilizadas de forma constante na ração, em doses subterapêuticas. Por oferecer benefícios econômicos significativos à agroindústria, o uso de antibióticos com a finalidade de obter ganho de peso e de melhorar a conversão alimentar, que ocorreu inicialmente de forma discreta, evoluiu seguidamente para o vasto uso generalizado na indústria de alimentação animal.

[006]. Porém, o uso indiscriminado de antibióticos ao longo dos anos tem resultado na geração de micro-organismos patogênicos resistentes e, por conseguinte, os resíduos dessas drogas são considerados ameaçadores à saúde humana. Esses indícios levaram as organizações ligadas à saúde humana e animal a recomendar prudência e restringirem cada vez mais o uso desses compostos. A tendência global é restringir a medicação antibiótica somente para o tratamento de enfermidades dos animais destinados ao consumo humano, abolindo a utilização como promotores de crescimento e de engorda, principalmente de bovinos, suínos e aves.

[007]. Com restrição ao uso de antibióticos na alimentação animal, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de substituir os antimicrobianos por outros ativos, como prebióticos, probióticos, extratos de plantas (extrato de alho, de noz moscada, de canela) e acidificação da água.

[008]. No âmbito dos probióticos, o uso de esporos bacterianos na alimentação animal ainda é pouco difundido no Brasil. Durante muito tempo, os estudos e patentes envolvendo as estirpes probióticas foram direcionados a gênero *Lactobacillus*, o qual necessita, para manter sua estabilidade e viabilidade, de processos que encarecem o produto final, como microencapsulação e liofilização. Porém, o mercado de nutrição

funcional necessita de produtos com altas concentrações de células viáveis e resistentes, uma vez que esse produto, contendo bactérias probióticas, deve resistir à ação do pH e das enzimas do trato digestivo. Se esses micro-organismos estão inviáveis ou em pequenas quantidades, ainda que confirmem benefícios ao hospedeiro, não será possível certificar a probiose.

[009]. Somente nos últimos anos houve um direcionamento às pesquisas e patentes relacionadas ao gênero *Bacillus* na forma esporulada. O esporo é uma estrutura robusta desenvolvida pelo próprio micro-organismo como estratégia de sobrevivência. Existe um grande interesse em maximizar a produção desses micro-organismos na forma esporulada, devido às características de resistência a fatores químicos e físicos que possibilitam sua preservação e viabilidade. Desta forma, o produto poderá chegar ao intestino em quantidades suficientes para desenvolver os mecanismos de benefício ao hospedeiro, não exigindo condições especiais de armazenamento e transporte, sendo resistente aos processos de peletização e com maior prazo de validade.

[010]. Também já é documentado que esporos bacterianos estão sendo usados como suplementos probióticos para uso em alimentos para animais, para consumo humano e em medicamentos. Apesar de ser um mercado promissor, a produção destes insumos com baixo custo, em altas concentrações e grandes escalas para utilização na agroindústria é um grande desafio. Os produtos existentes no mercado possuem concentrações de esporos da ordem de no máximo 10^9 ~ 10^{10} unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de material seco. Desta forma, a obtenção de um produto com maiores concentrações celulares é extremamente vantajosa, pois poderá ser adicionado em menor proporção à ração animal de modo a atingir a concentração celular final necessária ao efeito probiótico. Além disso, os produtos disponíveis

no mercado possuem em sua formulação ingredientes sintéticos, o que, por sua vez, encarece o processo devido ao alto custo da matéria prima. Na Tabela 1 estão relacionados os principais probióticos compostos por esporos bacterianos disponíveis no mercado nacional e internacional.

[011]. Tabela 1 – Probióticos disponíveis no mercado e suas principais características

Produto	País	Micro-organismo	Concentração (UFC/g massa seca)	Aplicação
CLOSTAT®	Estados Unidos	<i>B. subtilis</i>	$2,2 \times 10^8$	Avicultura e Suinocultura
BioGrow®	Reino Unido	<i>B. licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i>	$1,6 \times 10^9$	Avicultura e Suinocultura
Gallipro® Tect	Brasil e Dinamarca	<i>B. licheniformis</i>	$3,2 \times 10^9$	Avicultura
Bioplus 2B	Dinamarca	<i>B. licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i>	$3,2 \times 10^{10}$	Avicultura e Suinocultura
Alterion NE®	França, China e Dinamarca	<i>B. subtilis</i>	$1,0 \times 10^{10}$	Avicultura

Fonte: O Autor (2018)

[012]. A aplicação em larga escala dos aditivos probióticos existentes é suprimida pelos custos. Hoje, um “frango orgânico”, livre de antibióticos, é mais caro que o convencional pois o uso tradicional dos promotores de crescimento melhora a conversão alimentar dos animais, elevando os ganhos de produtividade. Por isso, a eliminação destes compostos da dieta enfrenta a resistência por parte dos produtores. Desta forma, um processo fermentativo econômico, que utiliza como ingredientes subprodutos e é realizado por meio de técnicas simples, com poucas

etapas e de baixo custo, tem potencial de viabilizar a produção em larga escala.

[013]. É escasso o que se reporta na literatura sobre as tecnologias de cultivo em fermentação no estado sólido (FES) com o objetivo de produção de esporos de *Bacillus*. Maiores dados e informações tecnológicas são encontradas nos processos de cultivo submerso, nos quais, porém, os rendimentos são menores envolvendo maior quantidade de etapas e de controle operacional. Quando contornadas as adversidades do processo de FES como: a formação de gradientes de temperatura, a dificuldade no controle das variáveis do processo e os custos com mão de obra, esta tecnologia de fermentação é extremamente vantajosa no sentido de propiciar altos rendimentos, redução da utilização da água no processo e minimização de etapas processuais na obtenção do produto final.

[014]. Não é reportada na literatura científica a produção de *B. subtilis* utilizando casca de soja como suporte e melaço como substrato, no regime de fermentação em estado sólido para a produção de esporos bacterianos. Algumas das referências do uso de *B. subtilis* com melaço de cana referem-se à produção de triptofano (Shasaltaneh et al., Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by *Bacillus subtilis*. Iranian Journal of Microbiology 5, 285–292, 2013), levana (Mantovan et al., Produção de levana por *Bacillus subtilis* natto utilizando caldo de cana-de-açúcar e diferentes sais. Caderno de Resumos Simbbtec 2014, 2014), fitase (Rocky-Salimi et al., Valorization of untreated cane molasses for enhanced phytase production by *Bacillus subtilis* K46b and its potential role in dephytinisation. Journal of the Science of Food and Agriculture 97, 222–229, 2017) e 2,3-butanodiol (Deshmukh et al., Production of 2,3-butanediol from sugarcane molasses using *Bacillus*

subtilis. International Journal of Advanced Biotechnology and Research 6 (1), 66-79, 2015).

[015]. Os documentos de patente BR200801567-A2 e BR102012032289-A2, deste mesmo grupo de pesquisa, relataram a produção de esporos de *Bacillus atrophaeus* entre outras espécies para uso como indicador biológico, utilizando subprodutos de soja e eventualmente de cana, porém em configuração diferente da presente invenção e com aplicação totalmente diversa, sem se referir a uma composição resultante.

[016]. O documento de patente CN103911325 descreveu o preparo de uma composição probiótica com *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* produzida por FES, com taxas de inoculação variando entre 1 e 7%, porém utilizando matérias primas comerciais (farelos de soja e milho) e obtendo uma concentração máxima de células da ordem de 10^9 UFC/g. O mesmo depositante também aplicou o documento CN103911326 relatando um processo semelhante, porém utilizando os micro-organismos *Bacillus coagulans* e *Bifidobacterium animalis*.

[017]. Recentemente, o documento de patente CN105886430-A relatou a produção de biomassa de *Bacillus amyloliquefaciens* por FES, porém utilizando ingredientes sintéticos e comerciais (farelo de trigo) e uma configuração de processo diferente da presente invenção, utilizando um fermentador agitado e com foco para o processo de esterilização por dióxido de cloro. A concentração final relatada foi a mais alta encontrada até o momento no estado da arte, da ordem de 10^{11} esporos por grama.

[018]. Também recentemente, o documento de patente CN106509339-A relatou a produção de *B. subtilis* como aditivo na alimentação animal,

utilizando folhas de *Eucommia* como substrato além de farelo de soja e farinha de milho (esses dois últimos, produtos comerciais). O processo envolveu o uso de cultura mista e uma etapa de liofilização, o que aumenta a complexidade tecnológica e os custos de produção. A concentração final relatada foi da ordem de 5×10^8 UFC/g.

[019]. Por último, o documento CN108148791 reivindicou uma composição probiótica contendo *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacillus coagulans* e *B. subtilis* produzida por fermentação submersa ou sólida, para uso em aquacultura. Da mesma forma, o preparo envolveu o uso de matérias primas comerciais (farelos de soja, milho e arroz) e elevado número de etapas, incluindo o pré-processamento da matéria prima.

[020]. Não foram reportados na literatura, seja em artigos científicos ou patentes, processos utilizando a fermentação em estado sólido para a produção de esporos de *B. subtilis* exclusivamente a partir de subprodutos da agroindústria, visando à produção econômica de aditivo probiótico para a nutrição animal e com o alto rendimento de esporos, da ordem de 10^{13} /g. Também não existe até o presente momento uma composição probiótica à base de resíduos agroindustriais (casca de soja, melaço e milhocina) contendo esporos de *B. subtilis* em alta concentração.

Descrição da abordagem do problema técnico

[021]. O desenvolvimento de processo e produto na presente invenção envolveu a seleção das matérias primas, seleção da técnica de cultivo, a otimização das variáveis físicas, químicas e nutricionais do cultivo, bem como a seleção do biorreator que propicia os maiores rendimentos. Nem todas as subespécies de *B. subtilis* esporulam nas mesmas condições, mas cada uma possui exigências nutricionais e ambientais específicas para o

seu desenvolvimento e produção de esporos com as especificações desejadas, conforme sua aplicação industrial, no caso atividade probiótica e ausência de toxicidade. Desta forma é importante que o processo de esporulação esteja de acordo a finalidade de uso do produto. No caso, para a produção de probióticos para alimentação animal, o meio de fermentação utilizado no processo fermentativo deve ser digerível e atóxico.

[022]. A produção do aditivo probiótico descrita neste documento destaca-se pelo baixo custo de obtenção do produto, caracterizada pelo processo de fermentação em estado sólido com componentes de cultivo classificados como subprodutos/resíduos agroindustriais, com obtenção de alta concentração de esporos bacterianos.

[023]. A viabilidade econômica do processo desenvolvido com base no levantamento dos custos da matéria prima, cujo valor para a produção de 1,0 kg é de aproximadamente R\$ 1,10, representa menos de 10% do preço do produto similar mais barato no mercado. Sendo que o produto da presente invenção apresenta uma concentração de esporos de, no mínimo, 3 log/g superior aos disponíveis no mercado, o que permite sua diluição em 1/1000 para se igualar ao produto similar. Salienta-se que foram pesquisados e determinados para o desenvolvimento deste processo os subprodutos das Indústrias regionais em sua forma *in natura* (sem tratamento prévio) e desenvolvidas técnicas de minimização de uso de equipamentos e operações unitárias na fabricação do aditivo, e, desta forma, esses fatores possibilitam uma maior redução de custos do processo industrial como um todo.

[024]. Em suma, o processo desenvolvido apresenta uma série de vantagens inovadoras, além das citadas, como:

a) Utilização mínima de inóculo: a cultura *starter* utiliza pouco volume de caldo de soja tripticaseína (TSB), minimizando a quantidade de meio de cultivo sintético (produto comercial) para a ativação da cepa;

b) Os resíduos e subprodutos agroindustriais utilizados, principais componentes do meio de cultura, são considerados “estáveis” no que tange aos aspectos de baixa susceptibilidade à contaminação, com alto prazo de validade e não exigem condições especiais de armazenamento;

c) O processo apresenta um rendimento 3 log/g (1.000 vezes) maior em relação aos produtos similares disponíveis no mercado;

d) Trata-se de um processo simplificado, com poucas etapas;

e) Utiliza-se matéria prima sem tratamento prévio;

f) O reator que se utiliza na fermentação (tipo bandeja) é também utilizado na secagem, não sendo necessária a troca e lavagem;

g) O processo desenvolvido não exige a etapa de *dowstream*, ou seja, separação do ativo do meio de cultivo, devido ao uso direto do fermentado seco e moído como alimento probiótico;

h) O processo desenvolvido tem baixo impacto ambiental, tem uso mínimo de água e não gera resíduos;

i) O processo desenvolvido é inovador, não descrito na literatura, apresenta alto rendimento (10^{13} UFC/g) e baixo custo.

[025]. Desta forma, o objetivo da presente invenção é oferecer ao mercado uma tecnologia de produção com custos reduzidos de processo e matéria prima que, por conseguinte, gera um produto com

aplicação, porém não limitada, no setor de nutrição animal em geral, incluindo piscicultura, com ênfase ao uso na avicultura industrial moderna, por ser uma alternativa ao uso de antibióticos.

Descrição detalhada da invenção

[026]. O processo para produção de aditivo probiótico, segundo a presente invenção, consiste nas etapas de (Figura 1):

- a. Preparo do meio sólido pela mistura de melaço, água de maceração do milho (milhocina) e água, ajuste de pH e adição à casca de soja;
- b. Esterilização do meio de cultivo sólido por calor úmido;
- c. Preparo de cultura iniciadora de *Bacillus subtilis* em cultivo submerso;
- d. Inoculação e fermentação em estado sólido para obtenção de esporos de *B. subtilis*;
- e. Secagem do fermentado sólido;
- f. Moagem do fermentado sólido.

[027]. O meio de fermentação (etapa a) possui a capacidade de promover uma alta taxa de multiplicação celular e subsequente formação de esporos. Todos os elementos do meio de cultivo são resíduos agroindustriais oriundos do processamento da soja, milho e de matérias primas sacarinas, tais como a cana de açúcar. Na composição de meio proposta, a casca de soja fornece o suporte para o crescimento do micro-organismo. As fontes de carbono principais são provenientes do melaço, por exemplo, o melaço de cana de açúcar. As fontes de nitrogênio principais são provenientes da milhocina.

[028]. O uso desses subprodutos contribui para o aproveitamento de resíduos, indiscutivelmente trazendo ganhos ambientais, bem como minimizando custos de matéria prima. Cabe aqui ressaltar que a viabilidade econômica do processo também é evidenciada porque os subprodutos são utilizados em sua forma *in natura*, sem a necessidade de tratamento prévio.

[029]. O processo da etapa "a" é realizado de modo a obter melaço, cuja concentração inicial, tal como gerado na indústria, é de 65-75°Brix, na proporção de 0,05 a 2 g/g de casca de soja; a milhocina (originalmente a 40-45°Brix) deve ser adicionada na proporção de 0,01 a 0,5 g/g de casca de soja; água deve ser adicionada na proporção de 1 a 2 mL/g de casca de soja e o pH antes da esterilização deve estar entre 11,0 e 13,0.

[030]. Preferencialmente, utiliza-se o melaço de cana na proporção de 0,1 a 0,5 g/g de casca de soja, assim como a milhocina na proporção de 0,01 a 0,05 g/g de casca de soja.

[031]. Um exemplo de preparação do meio de cultivo sólido envolve misturar primeiramente os componentes líquidos (melaço, milhocina e água), ajustar o pH com uma solução alcalina (por exemplo, hidróxido de sódio a 1 M) e então adicionar esta solução à casca de soja. Esse procedimento de mistura da solução líquida ao suporte sólido (casca) pode ser realizado, por exemplo, em sacos plásticos de polipropileno, resistentes à esterilização por calor úmido.

[032]. A etapa "b" do processo consiste na esterilização do meio de cultivo por calor úmido, de modo a eliminar contaminantes indesejados. Esta etapa deve ser realizada a uma temperatura entre 100 e 130°C, por tempo entre 10 e 45 min, em autoclave ou equipamento similar.

[033]. A etapa "c" do processo consiste no preparo do inóculo (cultura iniciadora) de *B. subtilis*. Preferencialmente, é utilizado o micro-organismo *Bacillus subtilis natto* NRRL B-3666, disponível no banco de culturas Agricultural Research Service (ARS), do Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). O meio de cultivo para propagação do micro-organismo é o caldo tripticaseína de soja ou similar, a temperatura de crescimento é de 25 a 39°C, e o tempo de crescimento é entre 12 e 48h.

[034]. Um exemplo de realização da etapa "c" é relatado a seguir: se o micro-organismo estiver disponível em ampola de vidro, o conteúdo da ampola é transferido para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 60 mL de caldo tripticaseína de soja. Se o micro-organismo estiver disponível em meio de cultivo sólido, três alçadas da cultura são transferidas para um frasco Erlenmeyer nessas mesmas condições. Incuba-se então esse frasco nas condições de temperatura e tempo descritas na etapa "c". Após a incubação, a cultura iniciadora deverá conter uma quantidade de células viáveis da ordem de pelo menos 10^6 UFC/mL. Caso seja necessário preparar volume maior de cultura iniciadora, em função da quantidade de casca de soja (ver etapa "d"), pode-se transferir um volume dessa cultura iniciadora para um novo meio líquido (caldo tripticaseína de soja) na proporção de 1:10 (v/v), e incubar nas mesmas condições. Esse procedimento de escalonamento pode ser realizado quantas vezes for necessário.

[035]. A etapa "d" consiste no processo fermentativo propriamente dito, que resulta na produção de biomassa de *B. subtilis* seguida de esporulação, ou obtenção de esporos de *B. subtilis*. O meio de cultivo previamente esterilizado na etapa "b" deve ser distribuído assepticamente em um recipiente horizontal estéril, a exemplo de uma bandeja, de modo a obter uma altura de leito entre 1 e 7 cm. Então,

deve ser adicionada, também assepticamente, a cultura iniciadora preparada na etapa "c" a uma proporção entre 0,01 e 0,1 mL/g de casca de soja, misturando-se em seguida. Na sequência, incuba-se o recipiente horizontal selado, por exemplo, com plástico estéril ou papel grau cirúrgico, a uma temperatura entre 25 e 39°C e tempo entre 24 e 72h. Preferencialmente, realiza-se essa etapa a uma temperatura entre 34 e 38°C e tempo entre 44 e 52h.

[036]. A etapa "e" caracteriza-se pela secagem do material fermentado, e é realizada a uma temperatura entre 40 e 60°C até atingir umidade entre 13 e 8%. Por exemplo, essa etapa pode ser realizada em estufa com ou sem circulação de ar, a pressão atmosférica ou reduzida.

[037]. A etapa "f" caracteriza-se pela moagem do material, de modo a reduzir a granulometria para valores entre 3 e 0,3 mm. Essa etapa pode ser realizada, por exemplo, em moinho de facas ou similar.

[038]. Após a realização dessas etapas o produto pode ser acondicionado em embalagens preferencialmente estéreis e à prova de umidade, e armazenado a temperatura ambiente.

[039]. A presente invenção contempla, ainda, uma composição probiótica produzida pelo processo anteriormente descrito, caracterizada por conter esporos de *B. subtilis* em concentração entre 1.10^8 e 1.10^{13} esporos/g, casca de soja na concentração de 70 a 85%, melaço na concentração de 0,5 a 25% e milhocina na concentração de 0,2 a 1,5%. A composição é caracterizada por ser sólida e conter umidade entre 13 e 8%.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ADITIVO PROBIÓTICO caracterizado por ser realizado nas etapas de:

- a. Preparo do meio sólido pela mistura de melaço (65-75°Brix), água de maceração do milho (milhocina, 40-45°Brix) e água, ajuste de pH entre 11,0 e 13,0 e adição à casca de soja, de modo a obter melaço na proporção de 0,05 a 2 g/g de casca de soja, milhocina na proporção de 0,01 a 0,5 g/g de casca de soja e água na proporção de 1 a 2 mL/g de casca de soja;
- b. Esterilização do meio de cultivo sólido por calor úmido;
- c. Preparo de cultura iniciadora de *Bacillus subtilis* em cultivo submerso;
- d. Inoculação e fermentação em estado sólido para obtenção de esporos de *Bacillus subtilis*;
- e. Secagem do fermentado sólido;
- f. Moagem do fermentado sólido.

2. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa "a" utilizando mais especificamente o melaço de cana na proporção de 0,1 a 0,5 g/g de casca de soja.

3. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa "a" utilizando mais especificamente a milhocina na proporção de 0,01 a 0,05 g/g de casca de soja.

4. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa "b" a uma temperatura entre 100 e 130°C, por tempo entre 10 e 45 min.

5. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa "c" a uma temperatura entre 25 e 39°C, por

tempo entre 12 e 48h, utilizando meio de cultivo tripticaseína de soja ou similar.

6. PROCESSO de acordo com as reivindicações 1 e 5, caracterizado pela realização da etapa "c" utilizando mais especificamente o micro-organismo *Bacillus subtilis natto* NRRL B-3666.

7. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa "d" distribuindo-se asépticamente o meio previamente esterilizado na etapa "b" em recipiente horizontal estéril, de modo a obter uma altura de leito entre 1 e 7 cm.

8. PROCESSO de acordo com as reivindicações 1 e 7, caracterizado pela realização da etapa "d" pela adição e mistura de cultura iniciadora preparada na etapa "c" ao meio de cultivo sólido a um volume entre 0,01 e 0,1 mL/g de casca de soja.

9. PROCESSO de acordo com as reivindicações 1, 7 e 8, caracterizado pela realização da etapa "d" a uma temperatura entre 25 e 39°C e tempo entre 24 e 72h.

10. PROCESSO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela realização da etapa "d" mais especificamente a uma temperatura entre 34 e 38°C e tempo entre 44 e 52h.

11. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa "e" a uma temperatura entre 40 e 60°C até atingir umidade entre 13 e 8%.

12. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa "f" de modo a reduzir a granulometria para valores entre 3 e 0,3 mm.

13. COMPOSIÇÃO PROBIÓTICA produzida pelo processo referido na reivindicação 1, caracterizada por conter esporos de *Bacillus subtilis* em concentração entre 1.10^8 e 1.10^{13} esporos/g, casca de soja na

concentração de 70 a 85%, melaço na concentração de 0,5 a 25% e milhocina na concentração de 0,2 a 1,5%.

14. COMPOSIÇÃO de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por ser sólida e conter umidade entre 13 e 8%.

DESENHOS

Figura 1

