



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 023026 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Processo de obtenção de leveduras probióticas e enriquecimento nutricional de resíduos para benefício à saúde humana e animal

Resumo: A presente invenção se insere no campo da microbiologia e nutrição animal, mais particularmente dentro do campo da aplicação de microrganismos especiais na conversão de resíduos em compostos nutricionais e melhoria das rações e nutrição animal. Nesta invenção foi demonstrado um tratamento biológico dos resíduos lignocelulósicos utilizando-se leveduras fibrolíticas capazes de promover a digestão parcial da fibra, melhorando a digestibilidade da mesma e aumentando o teor de nutrientes por meio da propagação das leveduras e consumo parcial da fibra. Desta forma foi provado: a) o crescimento destas leveduras em meios de cultura baratos e na ausência de oxigênio, b) produção de 20 aminoácidos (exceto W. onychis LABI2), c) produção de xilanases e celulasas d) composição química das favorável à nutrição animal d) hidrólise lignocelulósica parcial aumentando os nutrientes digestíveis totais. Esses resultados indicam o uso destas leveduras na alimentação animal, como probióticos a fim de aumentar a performance ruminal, e na conversão e enriquecimento nutricional de fibras usadas na composição das rações, tornando-as mais baratas e eficientes na conversão animal. São reivindicados os processos de obtenção das leveduras, os produtos obtidos e usos dos mesmos.

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Renan Padron Almeida

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 33778301896

Endereço: Rua Joaquim Antunes 819

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05415012

Telefone: 1156270570

Fax:

Email: renan.padron@unesp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: PEDRO DE OLIVA NETO

CPF: 04582812805

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Prado Kely, 389

Cidade: Assis

Estado: SP

CEP: 19806-380

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 5

Nome: THAÍS YUMI SHINYA

CPF: 37007593801

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100

Cidade: Assis

Estado: SP

CEP: 19806-900

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 5

Nome: EUTIMIO GUSTAVO FERNÁNDEZ NÚÑEZ

CPF: 23322394808

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100

Cidade: Assis

Estado: SP

CEP: 19806-900

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 5

Nome: FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

CPF: 44650728800

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida 24 A, 1515

Cidade: Rio Claro

Estado: SP

CEP: 13506-900

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 5

Nome: BRUNA ESCARAMBONI

CPF: 37714769840

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida 24 A, 1515

Cidade: Rio Claro

Estado: SP

CEP: 13506-900

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante GRU 9 371642.pdf
Procuração	Proc e Posse 07-2018.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: AF0952F

Data da Autorização de Acesso: 21/03/2019

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002549-6**DETALHE DO COMPROMISSO**

Convênio:	0033-0239-004900019792	Conta de Débito:	0239-000430023105
Tipo de Pagamento:	BLQ Outros		
Código de Barras:	00190000090294091619603371642178878760000007000		
No. compromisso banco:	1030412000100012	No. compromisso cliente:	371642/DS1 101009853
Nome/Razão Social do Beneficiário Original:	INPI - INST. NACIONAL DE PROPR		
Nome/Razão Social do Pagador Efetivo:	FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENT		
CPF/CNPJ do Pagador Efetivo:	57.394.652/0001-75		
Valor Nominal:	70,00		
Desc./Abat.:	0,00	Juros:	0,00
Data de Vencimento:	25/04/2019		
Data de Pagamento:	15/04/2019		
Situação:	Efetivado		
No. Lista de Débito:		No. Protocolo:	PGTFORNB15042019900137943
Autenticação:	11CBC4E034C3CE8AB742F94		

Valor a Pagar: 70,00[retornar](#)**Central de Atendimento Santander Empresarial**

Das 8h às 20h, de segunda a sexta-feira, exceto feriados.

4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)
0800 723 5007 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

SAC - Atendimento 24h por dia, todos os dias.

0800 762 7777

0800 771 0401 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

Ouvidoria - Das 9h às 18h, de segunda a sexta-feira, exceto feriado.

0800 726 0322

0800 771 0301 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

[imprimir](#)

PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento,

a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua,

nomeia e constitui seu procurador, **RENAN PADRON ALMEIDA**, brasileiro, portador do RG nº 43.746.608-5, SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 337.783.018/96,

outorgando-lhe poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI e outras instituições competentes, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de

Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP: 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópias, termos de cessão de direitos, termos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade intelectual, incluindo, mas não se limitando, aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou de licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado

todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

São Paulo, 16 de julho de 2018.



UNESP

pl Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Reitor

SERGIO ROBERTO NOBRE
VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA

9.º TABELÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 125 - 9º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3258-2011 - Fax: (11) 2174-6858
www.nopcartorio.com.br

Reconheço a 1 firma com valor econômico por semelhança de SERGIO ROBERTO NOBRE, do que dou fé.

Em tesº da verdade.

São Paulo/Capital, 24 de julho de 2018. Valor recebido R\$ 9,25
Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba

ANDREI BARRETO DA SILVA



Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP: 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

Termo de Posse e Compromisso do Professor Doutor Sandro Roberto Valentini como Reitor da UNESP

Quis dezasseis dias do mês de janeiro de dois mil e dezessete, às catorze horas e trinta minutos, no Teatro Santander, São Paulo, em sessão pública e solene do Conselho Universitário, o Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, por este ato, toma posse na função de Reitor da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com mandato de quatro anos, a contar de 15 de janeiro de 2017, conforme Decreto de nomeação de 28.11.2016, do excelentíssimo senhor Geraldo Alckmin, Governador do Estado de São Paulo, publicado no Diário Oficial do Estado de 29 de novembro de 2016 e retificado conforme publicação de 22 de dezembro de 2016. Na oportunidade, o empossado assume o compromisso de cumprir e fazer cumprir o Estatuto, o Regimento Geral e a legislação da UNESP, bem como as leis maiores do ensino no país. Para constar, foi elaborado o presente termo, assinado pelo Professor Doutor Julio Cezar Durigan, magnífico Reitor da UNESP, e pelo Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, ora empossado. São Paulo, 16 de janeiro de 2017.

[Assinatura de Julio Cezar Durigan]
[Assinatura de Sandro Roberto Valentini]

9.º TABELIÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 124 • 1.º no 6.º andar • CEP 01047-000 • São Paulo
Telefone: (11) 3259-2611 • Fax: (11) 2174-6858
www.noscartorio.com.br

Reconheço as 3 firmas sem valor econômico por semelhança de JULIO CEZAR DURIGAN, SANDRO ROBERTO VALENTINI, MARIA DALVA SILVA PAGOTTO. do que dou fé.

Em tes. da verdade. GUSTAVO FONTANA ANDOLPHO -
São Paulo/Capital, 16 de janeiro de 2017. Valor recebido R\$ 17,10
"Válido somente contra a falsificação. Selos pagos por verba"



S. Paulo, 06 MAR 2017



COLEGIO NO
113787
AUTENTICAÇÃO
1020AZ02

do Rote: Rua Rui Barbosa: 1.213,18 m² de recapetamento, no trecho entre as Ruas Luiz Gonzaga e Rio de Janeiro; Rua Luiz Gonzaga: 868,50 m² de recapetamento, no trecho entre as Ruas Rui Barbosa e Bernardino Pinto.

PARÁGRAFO ÚNICO: Inalterado.
CLÁUSULA SEGUNDA: A Cláusula Terceira, que trata das Obrigações dos Partícipes, passa a ter a seguinte redação: Para a execução do presente Convênio o ESTADO e o MUNICÍPIO terão as seguintes obrigações:

I - COMPETE AO ESTADO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

II - COMPETE AO MUNICÍPIO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

PARÁGRAFO PRIMEIRO: A prestação de contas a que se refere a alínea "e" do inciso II desta cláusula será encaminhada pelo MUNICÍPIO ao ESTADO, no prazo máximo de 30 (trinta) dias contados do encerramento da obra detalhada no cronograma físico-financeiro às fls. 31 e 106, e será encaminhada aos autos do processo correspondente para exame por parte do órgão competente.

PARÁGRAFO SEGUNDO: Inalterado;
PARÁGRAFO TERCEIRO: Inalterado;
CLÁUSULA TERCEIRA: A Cláusula Quarta, que trata do Valor, passa a ter a seguinte redação: O valor do presente Convênio é de R\$ 179.408,35, dos quais R\$ 160.000,00, de responsabilidade do ESTADO e o restante de responsabilidade do MUNICÍPIO. Ficam mantidas todas as disposições do Convênio firmado em 16-05-2014 e aditado em 29-08-2016, naquilo em que não colidirem com as ora estabelecidas.

ASSINATURA: 21-12-2016
Extrato de Termo de Aditamento
1º Termo de Aditamento
Processo: 158022/2016 (0780/2014)
CONVÊNIO: 496/2014
PARCEIR JURÍDICO: 708/2016
Objeto: Construção de Barracão Múltiplo Uso

PARTEÍCIPES: CASA CIVILISUBSECRETARIA DE RELACIONAMENTO COM MUNICÍPIOS E O MUNICÍPIO DE PIRAJUÍ
CLÁUSULA PRIMEIRA: A Cláusula Primeira, que trata do Objeto, passa a ter a seguinte redação: O presente Convênio tem como objeto a transferência de recursos financeiros para a execução de execução de construção de um Barracão Múltiplo Uso com área de 145,80m², localizado na Avenida da Saudade s/nº, Centro, conforme projeto às fls. 132/9.

1. Limpeza manual do terreno: 470,00m². 2. Brica de concreto p fundação: 182,60m. 3. Laje pré-fabricada: 172,00m². 4. Alvenaria em bloco cerâmico: 398,49m². 5. Porta lisa com batente de madeira: 12 pc. 6. Vidro liso: 27,18m². 7. Chapeiro: 972,98m². 8. Revestimento em placa cerâmica: 106,31m². 9. Piso cerâmico esmaltado: 201,79m². 10. Piso regularização e compactação: 309,10m². 11. Estrutura metálica p cobertura: 190,00kg. 12. Telha de barro: 172,00m². 13. Calhas e rufos: 92,40m. 14. Bacia sifonada c/ acoplada: 05 pc. 15. Lavatório de louça 01 pc. 16. Luminária: 28 pc. 17. Entrada de gás GLP c/ dois botijões de 13kg: 01 un. 18. Extintor manual p/ químico de 04kg: 02 pc. 19. Pintura tinta látex amarelo: 400,44m². 20. Instalações hidráulicas tudo PVC: 88,00m; 21. Serviços complementares diversos: 44,30m².

PARÁGRAFO ÚNICO: Inalterado.
CLÁUSULA SEGUNDA: A Cláusula Terceira, que trata das Obrigações dos Partícipes, passa a ter a seguinte redação: Para a execução do presente Convênio o ESTADO e o MUNICÍPIO terão as seguintes obrigações:
I - COMPETE AO ESTADO:
a) Inalterada;
b) Inalterada;
c) Inalterada;
II - COMPETE AO MUNICÍPIO:
a) Inalterada;
b) Inalterada;
c) Inalterada;
d) Inalterada;
e) Inalterada;
f) Inalterada;
g) Inalterada;
h) Inalterada;
PARÁGRAFO PRIMEIRO: A prestação de contas a que se refere a alínea "e" do inciso II desta cláusula será encaminhada pelo MUNICÍPIO ao ESTADO, no prazo máximo de 30 (trinta) dias contados do encerramento da obra detalhada no cronograma físico-financeiro às fls. 29 e 172, e será encaminhada aos autos do processo correspondente para exame por parte do órgão competente.

PARÁGRAFO SEGUNDO: Inalterado;
PARÁGRAFO TERCEIRO: Inalterado;
CLÁUSULA TERCEIRA: A Cláusula Sétima, que trata do Prazo, passa a ter a seguinte redação: O prazo para a execução do presente Convênio será de até 1120 (um mil e cento e vinte) dias, contados a partir da data de sua assinatura.

PARÁGRAFO PRIMEIRO: Inalterado.
PARÁGRAFO SEGUNDO: Inalterado.
Ficam mantidas todas as disposições do Convênio firmado em 23-05-2014 e aditado em 07-11-2016, naquilo em que não colidirem com as ora estabelecidas.

ASSINATURA: 21-12-2016
Extrato de Termo de Aditamento
1º Termo de Aditamento
Processo: 774102/16
CONVÊNIO: 204/2016
PARCEIR JURÍDICO: 740/2016
Objeto: Pavimentação, guias e sarjetas nas Ruas Benjamin Constant e Mato Grosso

PARTEÍCIPES: CASA CIVILISUBSECRETARIA DE RELACIONAMENTO COM MUNICÍPIOS E O MUNICÍPIO DE TAMBÁU
CLÁUSULA PRIMEIRA: A Cláusula Primeira, que trata do Objeto, passa a ter a seguinte redação: O presente Convênio tem como objeto a transferência de recursos financeiros para a execução de Execução de de 2.888,50m² de pavimentação asfáltica em CBQU, 1.134,00 m² de recapetamento asfáltico (CBQU, esp = 4 cm) e 638,35m de guias e sarjetas, em vias do Município, conforme projeto às fls. 114/3 e 117/126.

VIAs a serem beneficiadas: Rua Benjamin Constant: 2.322,99m² de pavimentação asfáltica em CBQU com base reforçada em pedra rachão e 335,35m de guias e sarjetas entre as Ruas Baldino Basilio e Mato Grosso; Rua Benjamin Constant: 1.134,00 m² de recapetamento asfáltico em CBQU com esp. 4 cm, entre as Ruas Mato Grosso e Anísia Maria Modesto; Rua Mato Grosso: 565,80m² de pavimentação asfáltica em CBQU com base reforçada em pedra rachão e 103,00m de guias e sarjetas entre a Rua Benjamin Constant e Avenida José Gatto.

PARÁGRAFO ÚNICO: Inalterado.
CLÁUSULA SEGUNDA: A Cláusula Terceira, que trata das Obrigações dos Partícipes, passa a ter a seguinte redação: Para a execução do presente Convênio o ESTADO e o MUNICÍPIO terão as seguintes obrigações:

I - COMPETE AO ESTADO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

II - COMPETE AO MUNICÍPIO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

i) Inalterada;

j) Inalterada;

k) Inalterada;

l) Inalterada;

m) Inalterada;

n) Inalterada;

o) Inalterada;

p) Inalterada;

q) Inalterada;

r) Inalterada;

s) Inalterada;

t) Inalterada;

u) Inalterada;

v) Inalterada;

w) Inalterada;

x) Inalterada;

y) Inalterada;

z) Inalterada;

aa) Inalterada;

ab) Inalterada;

ac) Inalterada;

ad) Inalterada;

ae) Inalterada;

af) Inalterada;

ag) Inalterada;

ah) Inalterada;

ai) Inalterada;

aj) Inalterada;

ak) Inalterada;

al) Inalterada;

am) Inalterada;

an) Inalterada;

ao) Inalterada;

ap) Inalterada;

aq) Inalterada;

ar) Inalterada;

as) Inalterada;

at) Inalterada;

au) Inalterada;

av) Inalterada;

aw) Inalterada;

ax) Inalterada;

ay) Inalterada;

az) Inalterada;

ba) Inalterada;

bb) Inalterada;

bc) Inalterada;

bd) Inalterada;

be) Inalterada;

bf) Inalterada;

bg) Inalterada;

bh) Inalterada;

bi) Inalterada;

bj) Inalterada;

bk) Inalterada;

bl) Inalterada;

bm) Inalterada;

bn) Inalterada;

bo) Inalterada;

bp) Inalterada;

bq) Inalterada;

br) Inalterada;

bs) Inalterada;

bt) Inalterada;

bu) Inalterada;

bv) Inalterada;

bw) Inalterada;

bx) Inalterada;

by) Inalterada;

bz) Inalterada;

ca) Inalterada;

cb) Inalterada;

cc) Inalterada;

cd) Inalterada;

ce) Inalterada;

cf) Inalterada;

cg) Inalterada;

ch) Inalterada;

ci) Inalterada;

cj) Inalterada;

ck) Inalterada;

cl) Inalterada;

cm) Inalterada;

cn) Inalterada;

co) Inalterada;

cp) Inalterada;

cq) Inalterada;

cr) Inalterada;

cs) Inalterada;

ct) Inalterada;

cu) Inalterada;

cv) Inalterada;

cw) Inalterada;

cx) Inalterada;

cy) Inalterada;

cz) Inalterada;

da) Inalterada;

db) Inalterada;

dc) Inalterada;

dd) Inalterada;

de) Inalterada;

df) Inalterada;

dg) Inalterada;

dh) Inalterada;

di) Inalterada;

dj) Inalterada;

dk) Inalterada;

dl) Inalterada;

dm) Inalterada;

dn) Inalterada;

do) Inalterada;

dp) Inalterada;

dq) Inalterada;

dr) Inalterada;

ds) Inalterada;

dt) Inalterada;

du) Inalterada;

dv) Inalterada;

dw) Inalterada;

dx) Inalterada;

dy) Inalterada;

dz) Inalterada;

ea) Inalterada;

eb) Inalterada;

ec) Inalterada;

ed) Inalterada;

ee) Inalterada;

ef) Inalterada;

eg) Inalterada;

eh) Inalterada;

ei) Inalterada;

ej) Inalterada;

ek) Inalterada;

el) Inalterada;

em) Inalterada;

en) Inalterada;

eo) Inalterada;

ep) Inalterada;

eq) Inalterada;

er) Inalterada;

es) Inalterada;

et) Inalterada;

eu) Inalterada;

ev) Inalterada;

ew) Inalterada;

ex) Inalterada;

ey) Inalterada;

ez) Inalterada;

fa) Inalterada;

fb) Inalterada;

fc) Inalterada;

fd) Inalterada;

fe) Inalterada;

ff) Inalterada;

fg) Inalterada;

fh) Inalterada;

fi) Inalterada;

fj) Inalterada;

fk) Inalterada;

fl) Inalterada;

fm) Inalterada;

fn) Inalterada;

fo) Inalterada;

fp) Inalterada;

fq) Inalterada;

fr) Inalterada;

fs) Inalterada;

ft) Inalterada;

fu) Inalterada;

fv) Inalterada;

fw) Inalterada;

fx) Inalterada;

fy) Inalterada;

fz) Inalterada;

ga) Inalterada;

gb) Inalterada;

gc) Inalterada;

gd) Inalterada;

ge) Inalterada;

gf) Inalterada;

gg) Inalterada;

gh) Inalterada;

gi) Inalterada;

gj) Inalterada;

gk) Inalterada;

gl) Inalterada;

gm) Inalterada;

gn) Inalterada;

go) Inalterada;

gp) Inalterada;

gq) Inalterada;

gr) Inalterada;

gs) Inalterada;

gt) Inalterada;

gu) Inalterada;

gv) Inalterada;

gw) Inalterada;

gx) Inalterada;

gy) Inalterada;

gz) Inalterada;

ha) Inalterada;

hb) Inalterada;

hc) Inalterada;

hd) Inalterada;

he) Inalterada;

Processo de obtenção de leveduras probióticas e enriquecimento nutricional de resíduos para benefício à saúde humana e animal

Campo da invenção:

[001] A presente invenção se insere no campo da microbiologia e nutrição animal, mais particularmente dentro do campo da aplicação de microrganismos especiais na conversão de resíduos em compostos nutricionais e melhoria das rações e nutrição animal. Dita invenção refere-se ao processo de propagação de células de microrganismos fibrolíticos e o uso deles com dois propósitos: a) como linhagens probióticas em insumo alimentícios para animais de produção e/ou pet shop ou até mesmo em alguns casos para consumo humano, podendo ser consumidos puros e/ou misturados na formulação das rações animais, ou alimentos em geral, porém em especial, para os ruminantes. b) A propagação destes microrganismos em meios de cultura especiais formulados com resíduos agroindustriais e/ou mistura com outras fontes serve como enriquecimento proteico e de outros nutrientes, e prévia digestão parcial das fibras contidas nos resíduos, permitindo assim a conversão parcial destes resíduos em valiosos nutrientes e maior digestibilidade dos mesmos. Assim este tratamento biológico destes resíduos torna-se uma opção econômica para as formulações de rações animais e ou/ nutrição humana.

[002] O referido processo compreende insumos essenciais e parâmetros específicos os quais conferem redução no custo da obtenção de proteínas e outros nutrientes, bem como no custo e adaptação de microrganismos probióticos à hidrólise de resíduos de baixa digestibilidade tais como resíduos

lignocelulósicos, além de adicional ganho nutricional a estes substratos.

Fundamentos da invenção:

[003] O aumento da população mundial consequentemente aumenta a demanda por nutrientes como proteína animal. A fim de aumentar a produtividade animal, o melhoramento genético trouxe como consequência a necessidade de alimentação mais nutritiva para que os ganhos de peso corporal possam ser cada vez mais rápidos.

[004] O uso de co-produtos ou resíduos da indústria de alimentos é uma importante opção estratégica atualmente para a solução da demanda de alimentos visando a produtividade e desempenho animal, tais como na criação de gado, porcos e aves (APÁS, A.L.; ARENA, M.E.; DRAKSLER, D.; GONZÁLEZ, S.N. Utilization of Sugarcane Industrial Residues as animal food and probiotic medium. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 106, n. 4, p. 363-367, 2008; CAMPBELL, I.F.G. In: PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I (Eds). Brewing Microbiology, 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. pp. 247-266). Entretanto, o uso de alguns resíduos lignocelulósicos para alimentação animal, como o bagaço de cana, é restrito e associado a tratamentos físicos (pressão e vapor) ou químicos (soda cáustica e amônia) devido à sua difícil digestibilidade, o que eleva custos e dificulta o acesso a estes tipos de resíduos, além da possibilidade destes tratamentos poderem gerar alguns compostos tóxicos (LIMA JR, D.M.; MONTEIRO, P.B.S.; RANGEL, A.H.N.; MACIEL, M.V.; OLIVEIRA, S.E.O. Sugarcane bagasse in ruminants nutrition. Revista Verde, v. 5, n. 2, p. 13 - 20, 2010).

[005] Outro problema é que os resíduos de maior valor nutricional tais como farelos de soja, algodão, quirera de milho, farelo de trigo, estão cada vez mais caros, sobretudo aqueles mais ricos em proteína como os primeiros citados. Esta elevação dos preços tem dificultado a utilização destas fontes e tornado as rações mais caras o que eleva muito o custo de produção da proteína animal.

[006] Por outro lado, o enriquecimento de resíduos de baixo valor nutricional por cultivo com microrganismos capazes de digerir sobretudo as fibras alimentares, e que ao mesmo tempo são ricos em nutrientes valiosos, tais como proteínas e vitaminas, pode ser uma solução potencial para os problemas apontados (27, 29, 104, 105, 108). (DURMIC, Z.; MOATE, P.J.; ECKARD, R.; REVELL, D.K.; WILLIAMS, R.; VERCOE, P.E. In vitro screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation. (Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 94, p. 1191-1196, 2013; FRANÇA, R.A.; RIGO, E.J. Utilization of alive yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) in ruminant nutrition - A review. FAZU, v. 8, p. 187-195, 2011; UGALDE, U.O.; CASTRILLO, J.I. Single cell proteins from fungi and yeasts. In: KHACHATOURIANS, G.G.; ARORA, D.K.; BERKA, R.M. (Eds). Applied mycology and biotechnology: Agriculture and food production. London: Elsevier, 2005. pp. 123-150; VALDUGA. E.; RIBEIRO, A.H.R.; CENCE, K. COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, p. 207-213, 2014; VILLAS-BÔAS, S.G.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D.A.

Animal Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Feed Science and Technology*, v. 98, p. 1-12, 2002). Porém estes microrganismos também não podem ser tóxicos e nem serem veículos para infecções nos animais de criação e precisam também serem palatáveis para os animais. Tais características não são fáceis de serem encontradas juntas num só microrganismo.

[007] O destaque dentre as características já mencionadas, está no fato destes microrganismos serem fibrolíticos, portanto serem capazes de produzir enzimas fibrolíticas tais como celulasas e xilanases, as quais degradam respectivamente, celulose e hemicelulose (xilana). Além disso, outras características são importantes tais como serem hábeis em crescer aeróbica e anaerobicamente e serem adaptáveis à microbiota ruminal, pois assim eles podem também exercer uma função probiótica, ou seja, auxiliarem nas funções metabólicas do animal, em especial tornando a atividade ruminal mais eficiente, e causando outros benefícios à saúde, além de servirem como nutrientes para o animal.

[008] Os probióticos são definidos como "preparação de células microbianas ou componentes de células que têm um efeito benéfico sobre a saúde e o bem-estar do hospedeiro" (GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 141, p. S15-S28, 2010; GUARNER, F.; PERDIGON, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, v. 93, p. 783-786, 2005; SALMINEN, S.;

OUWENHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: How should they be defined? Trends in Food and Science Technology, v. 10, p. 107-110, 1999). Os aditivos microbianos usados para melhorar o desempenho animal também são definidos pela Departamento de Alimentos e Medicamentos Norte Americano (FDA) como Aditivos de Alimentação Microbiana Direta (ou Direct-Fed Microbial - DFM), ou "fonte natural de microrganismos viáveis", substituindo o termo probiótico que foi usado anteriormente por empresas produtoras destes suplementos (FRANÇA, R.A.; RIGO, E.J. Utilization of alive yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) in ruminant nutrition - A review. FAZU, v. 8, p. 187-195, 2011). Entre os efeitos positivos do DFM podem ser citados como modulação da imunidade, aumento da flora intestinal, competição com microrganismos maléficos no trato gastrointestinal, produção de enzimas que auxiliam na degradação e digestibilidade da fibra alimentar, controle do pH e oferta de compostos essenciais para a saúde do hospedeiro (NEWBOLD et al., 1996; VILLAS-BÔAS et al., 2002; KUMURA et al., 2004; APÁS et al., 2008).

[009] Estudos sobre aditivos microbianos têm crescido levando-se em conta especialmente a natureza da ração utilizada para animais, que em grande parte alteram o ambiente gastrointestinal causando problemas de saúde e diminuição do seu desempenho (FRANÇA, R.A.; RIGO, E.J. Utilization of alive yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) in ruminant nutrition - A review. FAZU, v. 8, p. 187-195, 2011). Probióticos ou DFM utilizados no mercado farmacêutico são principalmente bactérias, e duas espécies principais de leveduras: *Saccharomyces boulardii* e

Saccharomyces cerevisiae (MARTINS, F.S.; TIAGO, F.C.P.; BARBOSA, F.H.F.; PENNA, F.J.; ROSA, C.S.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Utilization of yeasts as probiotics. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 5, 2005). Como aditivo animal, *S. cerevisiae* é a espécie mais utilizada em leveduras (FRANÇA, R.A.; RIGO, E.J. Utilization of alive yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) in ruminant nutrition - A review. *FAZU*, v. 8, p. 187-195, 2011). Há estudos que procuram novos microrganismos que podem atuar como DFM em humanos e animais. O rastreio por esses microrganismos é geralmente realizado isolando cepas do trato gastrointestinal ou de alimentos (KUMURA, H.; TANOUE, Y.; TSUKAHARA, M.; TANAKA, T.; SHIMAZAKI, K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science*, v. 87, 4050-4056, 2004).

[010] A inibição de microrganismos patogênicos no trato gastrointestinal de animais e seres humanos vinha sendo feita pelo uso Antibióticos Promotores de Crescimento (AGPs) na alimentação animal para controle desta bactérias, as quais podem ser transmitidas ao longo da cadeia alimentar, causando doenças humanas, porém essa prática foi abolida desde janeiro (2006) na União Européia, devido ao surgimento de microrganismos resistentes a antibióticos, exigindo outras alternativas para o controle dessas populações (GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 141, p. S15-S28, 2010). Nesse sentido, a atividade antagônica dos microrganismos probióticos aparece como

alternativa para o controle desses microrganismos patogênicos, aliada ao aumento da eficiência e produção dos animais de criação (MARTINS, F.S.; TIAGO, F.C.P.; BARBOSA, F.H.F.; PENNA, F.J.; ROSA, C.S.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Utilization of yeasts as probiotics. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 5, 2005).

[011] O estudo de novas espécies de DFM, bem como novos bioprocessos para produzir leveduras especiais a partir de fontes mais baratas, como resíduos agroindustriais de baixo custo, é relevante em vista da limitação das linhagens utilizadas (MARTINS, F.S.; TIAGO, F.C.P.; BARBOSA, F.H.F.; PENNA, F.J.; ROSA, C.S.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Utilization of yeasts as probiotics. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 5, 2005).

{012} Além disso, e do já citado aumento da digestibilidade da fibra por microrganismos fibrolíticos, o uso de células microbianas também pode ser uma valiosa fonte de proteína, sendo conhecida como proteína unicelular ou em inglês Single Cell Protein (SCP) (ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. Biotechnology Advances, v. 18, p. 459 - 479, 2000). Algas, fungos e bactérias podem ser usados como fontes de SCP, sendo ricos em proteínas, aminoácidos, carboidratos, vitaminas, gorduras e minerais essenciais que podem servir como suplemento dietético para humanos ou animais (ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. Biotechnology Advances, v. 18, p. 459 - 479, 2000; GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed

processing. Food Research International, v. 42, p. 577-587, 2011).

[013] Neste sentido, algumas leveduras fibrolíticas são interessantes para estudar e comparar com *S. cerevisiae* visando desenvolver novos bioprocessos para enriquecimento nutricional e descoberta de novas cepas probióticas ou DFM para produção animal. A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (Filo Basidiomycota, Ordem Sporidiobolales) é encontrada em todo o mundo (condições terrestres, aquáticas e extremas) (SAMPAIO, J.P. *Rhodotorula* Harrison (1928). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds). The Yeasts - A Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, 2011a. pp. 1873-1927).

[014] Devido à sua cor rosada, *Rhodotorula mucilaginosa* tem sido estudada para produção de pigmentos, principalmente β -caroteno, tolureno e torularodina (AKSU, Z.; EREN, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. Process Biochemistry, v. 40, p. 2985-2991, 2005; CHENG, Y.; YANG, C. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 61, p. 270-275, 2016; HAINAL, A.R.; CAPRARU, A.M.; VOLF, I.; POPA, V.I. Lignin as a carbon source for the cultivation of some *Rhodotorula* species. Cellulose Chemistry Technology, v. 46, p. 87-96, 2012; LIBKIND, D.; BRIZZIO, S.; VAN BROOCK, M. *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a patagonian high-altitude lake. Folia Microbiology, v. 49, n. 1, p. 19-25, 2004).

[015] Alguns pesquisadores também indicam a produção de enzimas como celulases em *Rhodotorula mucilaginosa*. (ARCURI et al. Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 106, n. 3, p. 475-487, 2014; LI et al. Diversity and biochemical features of culturable fungi from the coastal waters of Southern China. *AMB Express*, v. 4, p.1-13, 2014).

[016] Foi constatada também em *Rhodotorula mucilaginosa* a presença de lipases, esterase, proteases e pectinases. (LI, et al. Diversity and biochemical features of culturable fungi from the coastal waters of Southern China. *AMB Express*, v. 4, p.1-13, 2014; YANG et al. Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. *Bioresource Technology*, v. 129, p. 264-273, 2013; LEE et al. Some properties of extracellular acetylxylin esterase produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 12, p. 2831-2834, 1987; LARIO et al. Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *Fungal Biology*, v. 119, p. 1129-1136, 2015; ARCURI et al. Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 106, n. 3, p. 475-487, 2014; LUH, B.S.; PHAFF, H. Studies on polygalacturonase of certain yeasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 33, p. 212-227, 1951).

[017] Outra levedura interessante é *Wickerhamomyces onychis* (Filo Ascomycota, Família Phaffomycetaceae), comumente encontrada na água, no ar e no solo (KURTZMAN et al. *Wickerhamomyces*. (2008). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds) *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 5Ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. pp. 899-917, 2011), já que seu crescimento é relatado em alimentos humanos como "kimchi", um alimento de vegetais fermentados coreanos (OH, J.; HAN, Y. Purification and characterization of α -galactono- γ -lactone oxidase in *Pichia* sp. isolated from kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, v. 35, n. 6, p. 1135-1142, 2003) e "lafun", uma espécie de mandioca fermentada consumida em algumas partes do oeste da África ((HAHN, S.K. An overview of traditional processing and utilization of cassava in Africa. In: HAHN, S.K.; REYNOLDS, L.; EGBUNIKE, G.N. (Eds). *Cassava as livestock feed in Africa*. Nigeria: Ibadan, 1988. 173p).

[018] Em ambos os casos, a *W. onychis* faz parte de um consórcio de microrganismos responsáveis pelo processo de fermentação, que pode incluir a produção de enzimas e a construção de compostos aromáticos ao longo do processo (OYEWOLE, O.B. Characteristics and significances of yeasts involved in cassava fermentation of fufu production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 65, p. 215-218, 2001).

[019] *Sporobolomyces japonicus* (Fylum Basidiomycota, Ordem Sporidiobolales) é outra levedura especial, pois é capaz de consumir glicose, sacarose, rafinose, galactose, trealose, maltose, amido, celobiose, etanol, entre outros, por isso esta levedura apresenta um complexo sistema

enzimático, incluindo a capacidade de crescer em meio de cultura livre de vitaminas (HAMAMOTO, M.; BOEKHOUTAND, T.; NAKASE, T. *Sporobolomyces Kluyver & Vanniell* (1924). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds). *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 5Ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. pp.1929-1990). Portanto, o estudo do potencial biotecnológico desta espécie é interessante, tendo em vista a escassez de informações e algumas habilidades especiais deste microrganismo, justificando sua seleção nesta invenção.

[020] A levedura *Sporidiobolus pararoseus* (Filo Basidiomycota, Classe Microbotryomycetes e Ordem Sporidiobolales), é encontrada naturalmente no ambiente 92) e comumente associada com a superfície das uvas (SAMPAIO, J.P. *Sporidiobolus Nyland* (1949). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 5Ed. Amsterdam: Elsevier, 2011b. pp. 1556-1557; A literatura relata a produção de lipase, β -glicosidase, amilase e celulase por essa levedura. Além disso, *S. pararoseus* é um potencial agente de biocontrole, com efeito antagônico em vários microorganismos especialmente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, habilidades importantes como probiótico ou DFM para produção animal. Esta espécie também produz carotenoides, principalmente β -caroteno, γ -caroteno, tolureno e torularodina, que podem ter aplicações específicas para a nutrição de certos animais, como o salmão. (BAFFI et al. *Wine yeasts from Brazil: identification and screening for extracellular β -glucosidases*, *Journal of Biotechnology*, v. 150S, p. S1-S576, 2010; BRYSCH-HERZBERG, M.; SIEDEL, M. *Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions*. *International*

Journal of Food Microbiology, v. 214, p. 137-144, 2015; LI et al. Yeast species associated with wine grapes in China. International Journal of Food Microbiology, v. 138, p. 85-90, 2010); BUSSAMARA et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. Bioresource Technology, v. 101, p. 268-275, 2010; QIAO et al. Yeast and acidlactone in the five regions of Yunnan province. Microbiology China, v. 40, p. 567 - 575, 2013; SMANIOTTO et al. Synthetic lipase production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, v. 43, p. 1490-1498, 2012); BAFFI et al. A novel β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and application in winemaking. Journal of Food Science, v. 76, p. C997-C1002, 2011), amilase e celulase; QIAO et al. Yeast and acidolactone in the five regions of yunnan province. Microbiology China, v. 40, p. 567 - 575, 2013; HUANG et al. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. Biological Control, v. 62, p. 53-63, 2012; JANISIEWICZ et al. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. Yeast, v. 27, p. 389-398, 2010; MATIĆ, et al. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. Biological Control, v. 73, p. 59-67, 2014; SHARMA et al. *Sporidiobolus pararoseus* Fell & Tallman - an antagonistic yeast with biocontrol potential. Current Science, v. 95, p. 1003-1004, 2008; LACONI et al. Study and characterization of intestinal yeasts of mullet (*Mugil spp.*) for potential

probiotic use. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 5, p. 475 - 480, 2007); CABRAL, M.M.S. et al. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *European Food Research and Technology*, v. 233, p. 159-166, 2011; HAN et al. Carotenoids production in different culture conditions by *Sporidiobolus pararoseus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 42, p. 293-303, 2012; VALDUGA. et al. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, p. 207-213, 2014).

[016] A capacidade de crescimento em condições anaeróbicas é uma característica essencial de uma cepa probiótica, uma vez que o rúmen dos animais consiste num ambiente anaeróbico. A literatura afirma que *R. mucilaginosa* tem capacidade de crescer sem oxigênio. *W. onychis* foi isolado de alimentos fermentados e em biorreatores de fermentação alcoólica, portanto sua capacidade de crescer em condições anaeróbicas também foi confirmada. No entanto, as linhagens de leveduras *S. japonicus* Sia 70a e *S. pararoseus* Sia 33.1 em culturas sem oxigênio provocaram uma pequena inibição do crescimento de leveduras, o que foi demonstrado pelas colônias menores em placas de Petri. Infelizmente, há poucos relatos sobre o *S. japonicus* na literatura. (BRAD et al. Eukaryotic diversity in an anaerobic aquifer polluted with landfill leachate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n.13, p. 3959-3968, 2008; OLLIVIER et al. Aeration controls the reduction and methylation of tellurium by the aerobic,

tellurite-resistant marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, p. 4610-4617, 2011; VILLEGAS et al. Cu(II) removal by *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 in sequential batch cultures. *Water Science and Technology*, v. 60, n. 5, p. 1225-1232, 2009; HAHN, S.K. An overview of traditional processing and utilization of cassava in Africa. In: HAHN, S.K.; REYNOLDS, L.; EGBUNIKE, G.N. (Eds). *Cassava as livestock feed in Africa*. Nigeria: Ibadan, 1988. 173p; OH et al. Purification and characterization of α -galactono- γ -lactone oxidase in *Pichia* sp. isolated from kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, v. 35, n. 6, p. 1135-1142, 2003; CAMPBELL et al. (Eds). *Brewing Microbiology*, 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. pp. 247-266; IBARRA, G.K.C. Determination of osmotolerance in nine yeast strains isolated from fruits aiming industrial application in alcoholic fermentations. 2015. 106f. Mestrado (Dissertação em Engenharia Bioquímica) - Universidad Técnica de Ambato, Equador, 2015)

Dez cepas de *Sporobolomyces* pertencentes ao mesmo grupo de *S. japonicus* foram isoladas de folhas nos EUA. Estas espécies cresceram com sucesso em ambiente microaerófilo, embora em anoxia total (90% de nitrogênio) não foi observado crescimento significativo para todos os isolados. O teste de crescimento de *S. pararoseus* sob condição anaeróbica não foi encontrado para comparação. *Sporobolomyces roseus* é agora reconhecida como *Sporidiobolus pararoseus*, uma espécie capaz de crescer em anaerobiose e reconhecida como um metabolismo facultativo. (COBBAN et al. Revisiting the pink-red pigmented

basidiomycete mirror yeast of the phyllosphere. Microbiology Open, v. 5, p. 846-855, 2016; ALI et al. Nitrate assimilation in the basidiomycete yeast Sporobolomyces roseus. Journal of General Microbiology, v. 131, p. 1867-1874, 1989).

[017] A necessidade de fatores de crescimento como vitaminas e aminoácidos essenciais torna o microrganismo exigente do ponto de vista nutricional, o que eleva bastante o custo do meio de cultivo. Por isso microrganismos exigentes do ponto de vista nutricional não são interessantes quando se almeja a produção de proteína unicelular ou propagação de biomassa microbiana de baixo custo. Neste sentido, desejam-se microrganismos capazes de converter nitrogênio simples (e mais barato) em nitrogênio amínico ou de aminoácidos ou proteínas.

[018] *S. japonicus* é capaz de crescer em meio isento de vitaminas (HAMAMOTO et al. *Sporobolomyces* Kluyver & Vanniel (1924). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds). *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 5Ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. pp.1929-1990), porém Iizuka e Goto (1946) relataram a necessidade de crescimento da tiamina e a estimulação do crescimento na presença de ácido pantotênico. A capacidade de *S. pararoseus* de crescer em meio livre de vitaminas está de acordo com Sampaio (1949). SAMPAIO, J.P. *Sporidiobolus* Nyland (1949). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 5Ed. Amsterdam: Elsevier, 2011b. pp. 1556-1557).

[019] Sob condições anaeróbicas, *R. mucilaginosus* também mostrou ausência de crescimento apenas de tiamina. A produção dessa vitamina pode ser afetada dependendo da

fonte de carbono usada e pH. A levedura *W. onychis* isolada de um vegetal fermentado na Coreia produziu L-galactono- γ -lactona oxidase, uma enzima responsável pela produção de vitamina C (ácido ascórbico), na presença de ácido galacturônico como substrato. Como visto, esses microrganismos diferem das bactérias lácticas, cujas linhagens probióticas são muito exigentes do ponto de vista nutricional, tornando-os muito caros para a produção de proteína unicelular. (TABAK, H.H.; COOKE, W.M.B. Growth and metabolism of fungi in an atmosphere of nitrogen. *Mycologia*, v. 60, p. 115-140, 1968; SIERRA et al Production of B-group vitamins by two *Rhizobium* strains in chemically defined media. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, n. 5, p. 851-858, 1999; STRZELCZYK et al. B-group vitamins production by mycorrhizal fungi in response to pH (in vitro studies). *Plant and Soil*, v. 137, p. 237-241, 1991; OH, J.; HAN, Y. Purification and characterization of L - galactono - γ -lactone oxidase in *Pichia* sp. isolated from kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, v. 35, n. 6, p. 1135-1142, 2003).

[020] No presente trabalho essas leveduras foram selecionadas para estudar o conhecimento nutricional e metabólico como uma alternativa para: a) produção de enriquecimento nutricional com foco em proteína unicelular a partir de substratos de baixo custo, b) como novos probióticos para produção animal, c) além do enriquecimento nutricional de resíduos agroindustriais tais como o bagaço de cana, o qual possui uma fibra muito dura e recalcitrante de difícil digestão, também com o tratamento biológico usando leveduras fibrolíticas possibilitou aumento da

digestibilidade das fibras a partir de resíduos lignocelulósicos, tendo em vista que esses resíduos foram utilizados como principal fonte de carbono. Portanto, *Rhodotorula mucilaginosa* LABI1, *Wickerhamomyces onychis* LABI2, *Sporobolomyces japonicus* Sia 70a, *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1 foram as leveduras especiais selecionadas e comparadas com *Saccharomyces cerevisiae* M26 em culturas submersas aeróbias e anaeróbias.

Estado da técnica:

[021] Alguns documentos do estado da técnica relatam processos de crescimento das leveduras especiais selecionadas em meios contendo resíduos com propósito de produção de biomassa celular e algumas características metabólicas importantes; os quais são descritos a seguir.

[022] Díaz et al. (DÍAZ, A.; FLÓREZ, J.; COTES, A.M. Optimizing culture medium for producing the yeast *Pichia onychis* (Lv027). Revista Colombiana de Biotecnología, v. 7, n. 1, p. 51-58, 2005) avaliaram as condições ótimas para a produção de biomassa de *W. onychis* utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio (melaço, soja hidrolisada, levedura hidrolisada e milho hidrolisado). Os autores alcançaram 6,3 g/L de biomassa de levedura, correspondendo a $8,9 \times 10^9$ células/mL. Não encontramos trabalhos utilizando fontes lignocelulósicas como as reportadas na presente invenção.

[023] As culturas de *Candida utilis* e *Geotrichum candidum*, leveduras não estudadas no atual trabalho, mas que servem de base para dados de produção, obtiveram 15,0 g / L (0,27 g / g) e 19,5 g / L (0,33 g / g), respectivamente, com meio contendo bagaço de cana

hidrolisado (HOLDER, N.H.M.; KILIAN, S.G.; DU PREEZ, J.C. Yeast biomass from bagasse hydrolysates. *Biological Wastes*, v. 28, p. 239-246, 1989). Palha de arroz hidrolisada produziu 6,6 g / L de *Candida utilis* e 6,5 g / L de *S. cerevisiae* (ARAUJO, A.; D'SOUZA, A. Enzymatic saccharification of pretreated rice straw and biomass production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 28, p. 15-39, 1986) ; e hidrolisado de *Eucalyptus* obteve 6,4 g / L de *Paecilomyces variotii* (0,44 g / g rendimento, 0,10 h⁻¹ e 0,26 g / L x h produtividade) (SILVA, J.B.A.; MANCILHA, I.M.; VANNETTI, M.C.D.; TEIXEIRA, M.D. Microbial protein production by *Paecilomyces variotii* cultivated in *Eucalyptus* hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology*, v. 52, p. 197-200, 1995). Deve-se ressaltar que estes resultados só puderam ser obtidos por que as fonte de carbono, no caso bagaço de cana e palha de arroz foram hidrolisados previamente. Na nossa invenção, não há necessidade dessa hidrólise prévia, até por que isso representará substancial custo adicional. E a razão é justamente por que propomos leveduras fibrolíticas.

[024] Algumas espécies testadas já são relatadas como capazes de assimilar xilose, como *W. onychis* R. *mucilaginosus* e algumas cepas de *S. pararoseus*. (KURTZMAN, C.P. *Wickerhamomyces* Kurtzman et al. (2008). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds) *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 5Ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. pp. 899-917, 2011); SAMPAIO, J.P. *Rhodotorula* Harrison (1928). In: KURTZMAN et al. (eds). *The Yeasts - A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier, 2011a. pp. 1873-1927); Nyland (1949). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 5Ed. Amsterdam:

Elsevier, 2011b. pp. 1556-1557). No entanto, há pouca informação científica sobre a produção de biomassa de *R. mucilaginoso*, *W. onychis*, *S. japonicus* e *S. pararoseus*. Porém os trabalhos não relatam o potencial destas linhagens para hidrolisar substratos complexos tais como hemicelulose, e assim utilizar os açúcares mais simples como a xilose. Este fato ressalta a importância da presente invenção para o estudo da diversidade de leveduras e sua aplicação na biotecnologia.

[025] A cultura submersa de *S. pararoseus* na produção de carotenóides foi realizada para obter até 3,9 g / L de biomassa de leveduras (peso seco) em meio definido com diferentes concentrações de extrato de malte, peptona, glicose e extrato de levedura. (CABRAL, M.M.S.; CENCE, K. ZENI, J. TSAI, S.M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L.L.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; TREICHEL, H. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *European Food Research and Technology*, v. 233, p. 159-166, 2011). Em outro estudo, Valduga et al. (VALDUGA, E.; RIBEIRO, A.H.R.; CENCE, K. COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, p. 207-213, 2014) obtiveram 5,1 g/L da mesma levedura cultivada em meio contendo 40 g/L de glicerol, 40 g/L de maceração de milho e 20 g/L de água de arroz parboilizada. Machado e Burkert (MACHADO, W.R.C.; BURKERT, J.F.M. Influence of temperature in the extraction of microbials carotenoids. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, v. 6, p. 49-60, 2014) alcançaram

maior concentração de biomassa (7,18 g/L) de *S. pararoseus* com meio formulado com 7,5 g/L de glicerol e 25 g/L de maceração de milho, e produziram 8,3 g/L dessa levedura com meio formulado com 30 g/L de melaço de cana-de-açúcar e 6,5 g/L de licor de maceração de milho. Maldonade et al. (MALDONADE et al. Selection and characterization of carotenoids-producing yeasts from Campinas region, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, n. 1, p. 65-70, 2007) obtiveram 3,3 g/L de *Sporobolomyces roseus* usando meio complexo. O uso de extrato de levedura, extrato de malte, peptona e glicose aumentam sobremaneira o custo com o meio de cultura dificultando sua aplicação na produção de proteína unicelular. Na presente invenção, se propõe como principal nutriente, o uso de bagaço de cana, ou outro resíduo lignocelulósico de baixo custo, tais como palha de cana, talo ou sabugo de milho, casca de arroz e outros cereais, pó de serra, casca ou caule de frutas, resíduos alimentares, etc, para o cultivo desse tipo de microrganismo com habilidade fibrolítica, por ser bem mais econômico e o resíduo final pode ser utilizado como alimento após o cultivo, aumentando sua digestibilidade e enriquecendo-o com nutrientes valiosos.

[026] De fato, existem alguns estudos demonstrando a melhora dos parâmetros nutricionais das fontes lignocelulósicas após a inoculação com microrganismos. O resíduo de cana-de-açúcar foi utilizado como meio de cultura para inoculação de bactérias probióticas da flora de ruminantes misturadas com bactérias do ácido láctico (APÁS, A.L.; ARENA, M.E.; DRAKSLER, D.; GONZÁLEZ, S.N. Utilization of Sugarcane Industrial Residues as animal food

and probiotic medium. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 106, n. 4, p. 363-367, 2008). Os autores afirmam que este resíduo poderia ser utilizado como suplemento alimentar de ruminantes após a inoculação do silo com bactérias, obtendo-se bons valores de carboidratos (14,2%) e fibras (11,6%) e o crescimento de bactérias probióticas no rúmen. A porcentagem de proteína bruta do resíduo aumentou de 1,0% para 1,4% e cinzas e lipídios foram de 3,6% e 0,5%, respectivamente, após 60 dias de fermentação (APÁS, A.L.; ARENA, M.E.; DRAKSLER, D.; GONZÁLEZ, S.N. Utilization of Sugarcane Industrial Residues as animal food and probiotic medium. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 106, n. 4, p. 363-367, 2008). As bactérias lácticas são reconhecidamente os organismos utilizados para a conservação das forragens através dos processos de ensilagem. No entanto, em geral o crescimento láctico é acompanhado de queda do teor proteico, ou quando há algum aumento este é muito baixo. Na realidade, o objetivo principal deste método é a acidificação anaeróbica de alimentos contendo material lignocelulósicos, em geral capim, milho ou sorgo, para uso, em geral, em épocas de pouca oferta destes materiais frescos, em geral nos momentos de estiagem.

[028] Diferentemente do Estado da Técnica, a presente invenção não tem como objetivo a conservação da matéria orgânica como as bactérias lácticas, ou métodos de hidrólise química ou física das diferentes biomassas utilizadas só para aumento da digestibilidade, ou o uso de leveduras especiais probióticas de caráter não fibrolítico, que precisam ser crescidas em meios caros e que se limitam

apenas ao combate de outros microrganismos maléficos à microflora animal ou humana.

[029] A presente invenção se diferencia do Estado da Técnica justamente por empregar microrganismos fibrolíticos utilizando bioprocessos rústicos e cuja fonte de carbono é de baixo custo, pobre nutricionalmente, sem necessidade de digestão prévia via ácida, e/ou com álcalis e/ou com métodos físicos tais como o calor, ou mesmo com a adição de enzimas caras que inviabilizam essa aplicação.

[030] A presente invenção se diferencia justamente por que com apenas esta invenção é possível a transformação de um substrato de baixo custo e baixo valor nutricional e de baixa digestibilidade, em um substrato enriquecido nutricionalmente, aliado a propagação e presença de microrganismos ativos nestes substratos ou, isolando-os, de forma pura, capazes de conversão das fibras em proteínas e outros valiosos nutrientes, bem como enzimas fibrolíticas que irão atuar na digestão parcial da fibra, e capazes de crescer tanto em ambiente aeróbio como anaeróbio, propriedades muito desejadas para um DFM ou adição direta de microrganismos com habilidades probióticas.

Vantagens da invenção

[031] A invenção apresenta um método inovador onde é feito um tratamento biológico em resíduos, onde os mesmos são hidrolisados e convertidos parcial ou totalmente em biomassa enriquecida em nutrientes de alto valor biológico, tais como proteínas, vitaminas, pigmentos e sais minerais.

[032] O bioprocesso proposto é simples, sem precedentes, pois utiliza resíduos lignocelulósicos para aumento de teor proteico dos resíduos não hidrolisados,

produção de enzimas fibrolíticas e produção de microrganismos probióticos, diferentemente da silagem onde são empregadas técnicas de cultivo onde há produção de ácidos orgânicos visando apenas a preservação de alimentos, e não o enriquecimento proteico ou produção de microrganismos probióticos para os ruminantes.

[033] A invenção propõe ainda o uso de leveduras especiais tais como *Rhodotorula mucilaginosa* LABI1, *Wickerhamomyces onychis* LABI2, *Sporobolomyces japonicus* Sia 70a, *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1, dentre outras, apresentando potencial metabólico para utilização como proteína unicelular ou leveduras probióticas, capazes de crescer em meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar (ou outras fontes lignocelulósicas e/ou amiláceas ou açucaradas), em culturas anaeróbicas e aeróbicas.

[034] Esses microrganismos são capazes de crescer em um meio de cultura econômico, já que além de usar uma fonte de carbono mais barata, eles produzem a maioria dos aminoácidos. Produzem importantes enzimas fibrolíticas (xilanases e celulasas) e hidrólise parcial do bagaço de cana-de-açúcar com considerável enriquecimento desse resíduo em proteínas e outros nutrientes importantes para alimentação animal, com vantagens sobre a clássica levedura do gênero *Saccharomyces*, no caso *Saccharomyces cerevisiae* M26 foi empregada como representante desse grupo.

Breve descrição da invenção

[035] A presente invenção se insere no campo da microbiologia e nutrição, mais particularmente dentro do campo de seleção e cultivo de microrganismos, métodos de propagação celular, bioprocessos envolvendo cultivo

submerso aeróbio e anaeróbio, produção de enzimas fibrolíticas, digestão enzimática de compostos fibrosos, digestibilidade de compostos para preparo de rações animais, insumos probióticos para animais e ser-humano, composição química de biomassas e nutrição.

[036] A referida invenção refere-se ao processo de propagação de microrganismos especiais capazes de hidrolisar fibras em meios de cultura contendo alimentos fibrosos tais como resíduos lignocelulósicos, de difícil digestão, convertendo-os, parcialmente, em outros nutrientes mais valiosos tais como proteínas e aminoácidos, enzimas, minerais, dentre outros, para a nutrição humana e animal, e assim enriquecendo-se estes compostos mais pobres do ponto de vista nutricional, e de mais baixo custo, em produtos de maior valor nutricional e com maior digestibilidade.

[037] A referida invenção propõe um conjunto de parâmetros e bioprocessos envolvendo leveduras não convencionais, capazes de produzir enzimas xilanases e celulasas, por isso aqui denominadas leveduras fibrolíticas, as quais em condições convenientes atacam a fibra lignocelulósica (resíduos agroindustriais, madeira, etc) de difícil digestão, convertendo-a em compostos alimentares mais facilmente digeríveis e enriquecidos nutricionalmente, por exemplo com aumento de proteínas e aminoácidos, dentre outros, e com maior valor agregado.

[038] A referida invenção também propõe por meio de técnicas específicas, parâmetros e processos bem definidos, propagar de forma eficaz as citadas leveduras fibrolíticas, de forma que as mesmas possam ser usadas como linhagens

probióticas para os animais e seres humanos.

Descrição detalhada da invenção:

Visão geral

[039] Esta invenção consiste num conjunto de técnicas e parâmetros de processo envolvendo o desenvolvimento de um bioprocessos, composto de: a) formulação de um meio de cultivo específico, b) um novo biocatalizador microbiano, no caso algumas leveduras ditas "especiais" pois elas possuem algumas habilidades que as leveduras mais conhecidas não possuem, em especial, a produção de enzimas fibrolíticas c) o método de cultivo onde os dois primeiros são combinados de forma a obter a melhor performance no rendimento da biomassa de levedura e na hidrólise parcial das fibras envolvidas no meio de cultura. Assim sendo vamos descrever mais detalhadamente os três componentes deste bioprocessos.

Microrganismos e meio de cultivo

[040] Nesta invenção foram utilizados como biocatalisadores, quatro leveduras especiais *Rhodotorula mucilaginosa* LABI1, *Wickerhamomyces onychis* LABI2, *Sporobolomyces japonicus* Sia 70a e o *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1, e como controle, ou levedura tradicional e para efeito comparativo foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* M26.

[041] *Rhodotorula mucilaginosa* LABI1 e *Wickerhamomyces onychis* LABI2 foram isolados de farelo de arroz e *Sporobolomyces japonicus* Sia 70a e *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1 foram isolados do solo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* M26 isolada da indústria açucareira (OLIVA NETO, P.; FERREIRA, M.A.; YOKOYA, F. Screening for yeast with

antibacterial properties from an ethanol distillery. *Bioresource Technology*, v. 92, n. 1, p. 1-6, 2004) foi utilizada como modelo de levedura típica e mundial em bioprocessos.

[042] As leveduras foram identificadas por sequenciamento da região variável D1/D2 do gene rRNA da subunidade grande, amplificado com os iniciadores NL1 e NL4 (KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 73, p. 331-371, 1998). Extração de DNA genômico e PCR foram realizadas de acordo com Sampaio et al. (SAMPAIO, J.P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F.L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J.W. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 687-697, 2001) e Pagnocca et al. (PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N.S. BACCI, M.J. Yeast and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 94, p. 517-526, 2008) respectivamente. Os produtos foram purificados usando NucleoSpin Gel e PCR Clean-up (Macherey-Nagel, MN). As sequências frente e verso foram geradas no analisador genético ABI 3130 (Life Technologies) usando BigDye® Terminator v 3.1. Sequências foram editadas e usadas para montar contigs no BioEdit v 7.1.3 (HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, v. 41, p. 95-98, 1999). As bases de dados do

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) (www.cbs.knaw.nl) e do NCBI - GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) foram usadas para procurar seqüências homólogas. As seqüências de DNA foram depositadas no NCBI-GenBank sob os números de acesso KY911361-KY911364.

[043] O segundo componente do bioprocesso consiste na formulação do meio de cultura. Este foi desenvolvido especificamente para o crescimento e propagação das leveduras, e consiste da mistura de: a) sais minerais, b) uma fator de crescimento (podendo ser fonte de aminoácido, proteína e/ou vitaminas), e c) de uma ou mais fontes de carbono, em um tipo de bioprocesso de cultivo submerso ou cultivo semi-sólido ou em cultivo sólido.

[044] Estes três componentes não necessariamente precisam estar presentes juntos, podendo, alternativamente, o meio ser composto apenas da fonte de carbono, ainda que o resultado possa ser inferior. Portanto, preferencialmente o cultivo deve ser submerso, em meio líquido, e o três componentes do meio de cultivo devem estar preferencialmente juntos para se obter a melhor performance no rendimento de biomassa e velocidade de crescimento da cultura.

[045] Dentre os sais minerais que irão compor o meio de cultura, a seguir são listados aqueles considerados mais importantes, porém podem ser empregados outros diferentes sais e de diferentes marcas e pureza, dependendo das aplicações. Os sais minerais que compõe o meio de cultura são recomendados a seguir em proporção massa/volume: 0 a 2% preferencialmente 0,13% de $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, 0 a 2% preferencialmente 0,10% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0 a 1%

preferencialmente 0,02% de K_2SO_4 , 0 a 1% preferencialmente de 0,0028% $ZnSO_4$, 0 a 1% preferencialmente 0,0012% de $MnSO_4$ e 0 a 1% preferencialmente 0,024% de $MgSO_4$.

[046] Como modelo de fonte de carbono, nesta invenção foi utilizado de 0,1 a 50% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar, coletado em julho de 2013 na Destilaria Água Bonita (Tarumã/SP, Brasil), preferencialmente de 0,5 a 15% (m/v), mais preferencialmente ainda de 2 a 5% (m/v), acompanhado ou não de 0 a 20% de glicose ou qualquer outra fonte de açúcar nutritivo como sacarose, galactose, lactose, etc, porém preferencialmente deve-se utilizar 0,05% de glicose ou sacarose. Alternativamente, podem ser usadas quaisquer outras fontes de carbono contendo materiais lignocelulósicos, amiláceos e/ou açucarados. Dentre eles, destacam-se caules, talos, folhas, raízes e sementes de plantas vegetais, ou parte delas, tais como sabugo e talo e folha de milho, farelos de cereais (sorgo, soja, algodão, etc), pó de serra ou galhos a partir de árvores, palha de vegetais (palha da cana, milho etc), restos de comida e alimentos vencidos.

[047] Todos estes materiais aqui denominados fontes de carbono podem ser usados diretamente, ou lavados com água por 1- 100 minutos, preferencialmente de 1 a 15 minutos, para retirada de impurezas como terra, areia ou outros compostos que por ventura estejam impregnados e não irão participar do bioprocessamento. No caso das amostras serem lavadas, elas podem ser, em seguida, secas e moídas ou serem utilizadas diretamente com ou sem a lavagem. No caso da moagem das fontes de carbono, para obtenção das partículas do tamanho de interesse, deve-se processar a moagem de

forma a obter partículas de comprimento de 0,001 mm a alguns centímetros, mas preferencialmente as fontes de carbono devem ter 0,001 a 1,4 mm de comprimento, a fim de facilitar a ação enzimática.

[048] Como fonte de fatores de crescimento, pode-se ainda adicionar no meio de cultura diferentes nutrientes do tipo extratos tais como extrato de carne, peptona, levedura ou outros microrganismos, água de maceração de milho, água de batata, gérmen de trigo ou outro tipo de cereais, farinha de aveia, trigo, milho, soja dentre outros. Nesta invenção está sendo proposto o uso de 0 a 15% (m/v) de extrato de levedura ou levedura autolisada, preferencialmente 0,05 a 0,20 % (m/v) ou, como alternativa, de 0 a 15% de água de maceração de milho, preferencialmente 0,1 a 1%, mais preferencialmente 0,5% (m/v) deste último nutriente. Os fatores de crescimento, em geral proteínas, aminoácidos e/ou vitaminas, servem para complementar alguns elementos nutricionais essenciais que por ventura sejam demandados pelos microrganismos.

[049] Após misturados os nutrientes e formulado o meio de cultura, este pode ou não sofrer correção do pH para a faixa de 3 a 7,0, preferencialmente de 5 a 6 com adição de ácido ou base. O meio pode ser diretamente utilizado no bioprocessamento ou, alternativamente, pode ser esterilizado ou pasteurizado, utilizando-se diferentes métodos físicos e/ou químicos, mas, preferencialmente, métodos físicos tais como a pasteurização a temperaturas inferiores a 80°C, ou autoclavagem ou o vapor direto devem ser empregados, com temperaturas superiores à 80°C. Ressalta-se que por questões de custos o tratamento térmico

não é imprescindível, podendo utilizar-se o meio não estéril, ainda que com maiores riscos de contaminação.

Seleção do Bioprocesso - Cultivo Submerso por Batelada Simples e Alimentada

[050] O terceiro componente do desenvolvimento deste bioprocesso consiste na forma como será feita a propagação da cultura de leveduras e a separação do produto final. O crescimento da cultura pode ser feito em condições aeróbia ou anaeróbia. A fase de propagação onde se espera o aumento da biomassa microbiana é melhor desenvolvida preferencialmente em condições aeróbias em biorreatores do tipo tanques, tubos ou quaisquer outros tipos de equipamentos que possa ser multiplicada a biomassa das leveduras, misturando-se o inóculo de leveduras e o meio formulado, com preferencial adição de ar.

[051] A capacidade de crescimento de leveduras em ambiente anaeróbio foi avaliada através de culturas de placas de Petri com Agar de Dextrose de Batata (PCA) (3,9% p / v) incubadas com pote anaeróbio (Anaerocult, Merck, Darmstadt, Alemanha) com anaeróbio gerador (Anaerobac, Probac, São Paulo , Brasil) a 33 ° C por 72 h. A capacidade de crescer foi avaliada visualmente e comparada com placas de petri de controle cultivadas na presença de oxigénio nas mesmas condições. Este método é importante e foi usado para provar a capacidade de crescimento anaeróbio das linhagens em questão, pois isso terá um resultado positivo no rumo do animal demonstrando uma das características probióticas da cultura.

[052] A forma como será feita a combinação do meio de cultura com o inóculo de leveduras é muito importante para

desenvolver os melhores parâmetros cinéticos de avaliação do bioprocesso: rendimento de biomassa, produtividade e velocidade específica de crescimento.

[053] Como neste trabalho é recomendado o cultivo submerso, o mesmo foi avaliado através de duas formas de alimentação do substrato: Batelada simples (Batch) ou Batelada Alimentada (Fed-Batch). Porém há ainda uma terceira forma, o processo Contínuo, onde a entrada de meio de cultura e a saída do produto são feitos de forma simultâneas, fazendo-se primeiro o início da cultura em Batelada. Este terceiro tipo, o Contínuo, não foi empregado neste trabalho devido aos riscos de contaminação que ele oferece, mas como este bioprocesso é muito rústico, também pode ser usada essa forma de alimentação do substrato.

[054] No experimento realizado, o cultivo foi avaliado inicialmente em batelada simples. A Cultura aeróbia submersa foi feita em biorreator (Bioflo 115, New Brunswick, Nova Jersey, EUA) em batelada única com *R. mucilaginosa* LABI1, *W. onychis* LABI2, *S. japonicus* Sia 70a, *S. pararoseus* Sia 33.1 e *S. cerevisiae* M26. Após os testes de cultivo em Batelada Simples, foram selecionadas duas linhagens para avaliar os cultivos em Batelada Alimentada. Neste caso, foram selecionadas as linhagens *R. mucilaginosa* LABI1 e *S. cerevisiae* M26. Alguns parâmetros de processo foram fixados para as culturas em Biorreatores: 28°C, 1 vvm de suprimento de ar e pH 5,5 ($\pm$ 0,1) controlados com a adição de 1,0% (v / v) de H₂SO₄ ou 1,0 M de NaOH. O oxigênio dissolvido e o pH foram medidos com eletrodo de oxigênio e eletrodo de vidro (Mettler Toledo AG, Greifensee, Suíça), respectivamente.

[055] No experimento realizado, a composição do meio para o cultivo das leveduras variou entre os cultivos em Batelada simples e Batelada Alimentada, sendo que no primeiro tipo de cultivo foi utilizado além dos componentes salinos já descritos anteriormente, os seguintes nutrientes (p / v): 2,0% de bagaço de cana, 0,05% de glucose e 0,2% de extrato de levedura. No caso da Batelada Alimentada, o meio de cultura para *R. mucilaginosa* LABI1 e *S. cerevisiae* M26 foi composto por (p / v) 5,0% bagaço de cana, e a adição de 0,5% de água de maceração de milho no lugar da adição dos sais nitrogenados tais como sulfato de amônia.

[056] A cultura tanto pelo método de Batelada Alimentada como na Batelada simples pode ocorrer entre 1 e 240 horas ou até mais horas, porém preferencialmente entre 24 e 120 h e mais preferencialmente entre 48 a 120 horas dependendo do tipo de cultivo. Assim evitam-se riscos de contaminação e a produtividade do processo é melhor. No cultivo em Batelada todo o meio de cultura e o inóculo são misturados no tempo inicial, e pode ser usado o tempo de 72 horas, já no cultivo em Batelada alimentada pode ser estendido o cultivo até 120 horas ou até mais dependendo das condições. A agitação mecânica não é indispensável, mas recomendada, e seu uso deve ser de 5 a 400 rpm, preferencialmente de 20 a 200 rpm a fim de homogeneizar a cultura facilitando o encontro entre biocatalizador e os nutrientes.

[057] Como já dito, a adição de ar na cultura também não é indispensável, mas preferencial. Neste caso, a adição de ar ou oxigênio pode ser feita, porém se for adicionado o ar este deve ser entre 0,01 a 4 vvm (ou volume de ar por

volume de tanque por minuto), preferencialmente de 0,3 a 2,0 vvm e mais preferencialmente de 1,0 a 1,7 vvm para *R. mucilaginosus LABI1* e *S. pararoseus Sia 33,1*, *W. onychis LABI2*, *S. japonicus Sia 70a* e *S. cerevisiae M26*.

[058] O processo de batelada alimentada pode ser feito de forma intermitente, contínua de forma linear ou escalonada. Neste trabalho foi testada a alimentação intermitente por ser mais simples e demandar menos equipamentos. Três lotes de meio de cultura de 300 mL cada, contendo o mesmo meio, foram adicionados nos tempos de cultivo de 12, 32 e 72 horas.

[059] O suprimento de bagaço de cana ao longo da cultura foi feito de forma tal que fosse calculado de acordo com a manutenção do mesmo nível de concentração de sólidos no início da cultura (5,0%), retirando-se amostras e medindo-se com balanço de umidade (BTS110, Scientific Industries, Polônia). A agitação mecânica foi aumentada de 200 rpm para 300, 400 e 500 rpm após cada alimentação, devido ao aumento da concentração de sólidos. A cultura em Batelada alimentada foi finalizada após 120 h de cultivo.

[060] O inóculo de levedura pode ser preparado conforme as recomendações já mencionadas para a propagação em batelada simples ou alimentada, e com os meios de cultivo já apresentados ou, alternativamente, cada cultura de levedura pura pode ser cultivada com 50 mL do mesmo meio formulado para cultura de biorreator com glicose a 1,0% sem bagaço de cana e incubada em incubadora orbital (TE421, Tecnal, Piracicaba / SP, Brasil) por 24 h, 28 ° C e 180 rpm.

[061] A separação do meio líquido e residual SB após

culturas submersas ocorreu através de filtração manual utilizando tecido polimérico. O líquido foi centrifugado para separação celular a 5000 x g (força gravitacional) durante 30 minutos, 4 (Megafuge 16R, Heraeus, Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). Tanto a biomassa de levedura quanto o resíduo foram secos em estufa (TE394 / 2, Tecnal, Piracicaba / SP, Brasil) por 72 horas a 50 ° C antes dos testes nutricionais. A biomassa seca no final da cultura foi realizada de acordo com Chen et al. (CHEN et al. Oil production on wastewaters after butanol fermentation by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. Bioresource Technology, v. 118, p. 594-597, 2012) por secagem a peso constante a 105°C (TE394/2, Tecnal, Piracicaba/SP, Brasil); por secagem a peso constante a 105 ° C (TE394 / 2, Tecnal, Piracicaba / SP, Brasil).

Análises e acompanhamento do processo

[062] Recomenda-se realizar amostragens ao longo da cultura para acompanhar a propagação celular. Os métodos de avaliação do crescimento são vários possíveis, desde plaqueamento, contagem direta, turbidez ou análise de componentes celulares, mas uma curva de crescimento pode ser construída através de concentração celular direta utilizando-se a câmara de contagem Neubauer e avaliando-se também a viabilidade das células de leveduras após a utilização de azul de metileno (0,01% m/v) ou outros corantes (LEE, S.S.; TOBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. Biotechnology and Bioengineering Symposium, v. 11, p. 641-649, 1981).

[063] Açúcares redutores (AR) podem ser quantificados de acordo com Miller (MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic

acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426, 1959) e xilanases e celulasas (CMCase) conforme, respectivamente, Carvalho et al. (CARVALHO et al. Screening of xylanolytic *Aspergillus fumigatus* for prebiotic xylooligosaccharide production using bagasse. Food Technology and Biotechnology, v. 53, p. 428-435, 2015) e Ghose (GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, v. 59, p. 257-268, 1987). Uma unidade enzimática significa a liberação de 1 μmol de AR por minuto por mL de extrato enzimático. Quando necessário, a quantificação de açúcares redutores totais (ART) pode ser feita após hidrólise ácida com H_2SO_4 (2,0 M), na proporção de 1:1 (amostra:solução ácida), por 10 minutos a 100°C seguida de neutralização com NaOH (2,0 M) (Synth, São Paulo, Brasil) na proporção 1:1:1 (amostra:solução ácida:solução alcalina) e quantificação pelo método de Miller (MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426, 1959).

[064] Os parâmetros cinéticos taxa de crescimento específico máxima (μ_{max}), coeficiente de rendimento de crescimento celular ($Y_{\text{x/s}}$) e produtividade de biomassa podem ser determinados (SHULER, M.L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering: Basic Concepts. United States of America: Prentice Hall PTR; p. 576, 2002), bem como taxa específica de consumo de O_2 em cultura de lote usando bagaço de cana (NÚÑEZ et al. Influence of aeration-homogenization system in stirred tank bioreactors, dissolved oxygen concentration and pH control mode on BHK-21 cell growth and metabolism. Cytotechnology, v. 66, n. 4, p. 605-617, 2014) considerando

concentração saturada de O₂ a 28°C (0,244 mMol/L).

[065] A análise nutricional e a composição química da biomassa podem ser quantificadas de acordo com os métodos da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (HELRICH, K. (Ed). Official methods of analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Virginia, USA, 1990). A quantificação das cinzas pode ser realizada após a queima em forno mufla por, preferencialmente 6h a 700°C. A massa seca poderá ser medida por gravimetria, após secagem a 105°C até peso constante (BTS110, Scientific Industries, Polônia). A extração etérea pode ocorrer com uso de solventes, preferencialmente éter de petróleo e por 6 h com equipamento Soxhleht. A proteína bruta foi quantificada pelo método de Kjeldahl e a fibra bruta foi quantificada após hidrólise ácida (H₂SO₄) e alcalina (NaOH) - 1,25% - a 400°C por 40 min e secagem a 105°C por 24 h. Podem ser calculados os Extratos Não Nitrogenados e Nutrientes Digestíveis Totais de acordo com método descrito por Kearl (KEARL, L.C. Nutrient requirements of ruminants in developing countries. 1982. 390f. Tese (Doutorado em Filosofia da Ciência Animal) - Utah State University, Utah, EUA, 1982).

[066] A biomassa de levedura obtida a partir da condição de centrifugação descrita poderá ser utilizada para determinar os minerais, como carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, cálcio, potássio, magnésio e zinco, utilizando-se preferencialmente os parâmetros da AOAC (HELRICH, K. (Ed). Official methods of analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Virginia, USA, 1990).

Testes de aminoácidos e vitaminas de omissão única

[067] Cada aminoácido puro (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) foi avaliado em culturas de tubos de leveduras por meio sintético com 19 a 20 aminoácidos a 0,03% (m/v), meio de cultura basal, 2,0% de glicose (m/v) e 8 vitaminas. As vitaminas (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) utilizadas foram: ácido aminobenzóico (0,2 µg/mL), ácido ascórbico (2 µg / mL), ácido fólico (0,02 µg / mL), ácido nicotínico (2 µg / mL), pantotênico ácido (1 µg/mL), piridoxina (2 µg/mL), riboflavina (2 µg/mL) e tiamina (1 µg/mL). A avaliação das vitaminas foi realizada em culturas de tubos de leveduras utilizando 7 de 8 vitaminas no meio de cultura basal, 2,0% de glicose e 20 aminoácidos puros (0,03%). A capacidade de leveduras em crescer na ausência de um aminoácido ou vitamina pura específica foi avaliada como ausência, crescimento fraco, parcial ou total. Tubos contendo todos os aminoácidos essenciais e vitaminas (controle positivo) e sem aminoácidos ou vitaminas (controle negativo) foram realizados. O crescimento celular foi avaliado após 120 h de incubação a 28°C medindo a turbidez da cultura a 600 nm usando espectrofotômetro (UV-M51, Bel Engineering, Monza, Itália) (OLIVA NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. Revista de Microbiologia, v. 28, p. 25-31, 1997).

Análise estatística

[068] Os testes foram realizados em triplicatas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey entre as repetições utilizando o programa GraphPad Prism Versão 5.01 (Universidade de Rutgers). Os tratamentos foram analisados

estatisticamente e considerados significativos com $p < 0,05$. Os gráficos foram criados com o Microsoft® Excel (Microsoft® Office 365).

Exemplos experimentais

[069] Os exemplo experimentais a seguir ilustram a presente invenção sem, contudo, limitar o escopo da presente invenção exclusivamente aos mesmos.

[070] Exemplo experimental I - Culturas de leveduras em anaerobiose - A cultura de leveduras em frasco anaeróbico demonstrou que todas as 4 cepas foram capazes de crescer sob ambiente anaeróbico ou são leveduras facultativas desde que também crescem em ambiente aeróbico. Estes resultados estão de acordo com a literatura (BRAD et al. Eukaryotic diversity in an anaerobic aquifer polluted with landfill leachate. Applied and Environmental Microbiology, v. 74, n.13, p. 3959-3968, 2008; OLLIVIER, et al. Aeration controls the reduction and methylation of tellurium by the aerobic, tellurite-resistant marine yeast Rhodotorula mucilaginosa. Applied and Environmental Microbiology, v. 77, p. 4610-4617, 2011; VILLEGAS et al. Cu(II) removal by Rhodotorula mucilaginosa RCL-11 in sequential batch cultures. Water Science and Technology, v. 60, n. 5, p. 1225-1232, 2009), que afirmou R. mucilaginosa tem capacidade de crescer sem oxigênio. W. onychis foi isolado de alimentos fermentados (HAHN, S.K. An overview of traditional processing and utilization of cassava in Africa. In: HAHN, S.K.; REYNOLDS, L.; EGBUNIKE, G.N. (Eds). Cassava as livestock feed in Africa. Nigeria: Ibadan, 1988. 173p; OH, J.; HAN, Y. Purification and characterization of l - galactono - γ -lactone oxidase in Pichia sp. isolated

from kimchi. Korean Journal of Food Science and Technology, v. 35, n. 6, p. 1135-1142, 2003) e em biorreatores de fermentação alcoólica (CAMPBELL, I.F.G. In: PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I (Eds). Brewing Microbiology, 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. pp. 247-266; IBARRA, G.K.C. Determination of osmotolerance in nine yeast strains isolated from fruits aiming industrial application in alcoholic fermentations. 2015. 106f. Mestrado (Dissertação em Engenharia Bioquímica) - Universidad Técnica de Ambato, Equador, 2015) sua capacidade de crescer em condições anaeróbicas também foi confirmada. No entanto, as estirpes de leveduras *S. japonicus* Sia 70a e *S. pararoseus* Sia 33.1 em culturas sem oxigênio provocaram uma pequena inibição do crescimento de leveduras, o que foi demonstrado pelas colônias menores em placas de Petri. Ambas as cepas possuem uma coloração rosa em condições aeróbicas, que pareciam visualmente menos cor-de-rosa sob condições anaeróbicas, embora mais estudos sejam necessários para confirmar este resultado. Infelizmente, há poucos relatos sobre o *S. japonicus* na literatura. Dez cepas de *Sporobolomyces* pertencentes ao mesmo gênero de *S. japonicus* foram isoladas de folhas nos EUA. Estas espécies cresceram com sucesso em ambiente microaerofílico, embora em anoxia total (90% de nitrogênio) não foi observado crescimento significativo para todos os isolados (COBBAN et al. Revisiting the pink-red pigmented basidiomycete mirror yeast of the phyllosphere. Microbiology Open, v. 5, p. 846-855, 2016). O teste de crescimento de *S. pararoseus* sob condição anaeróbica não foi encontrado para comparação. Segundo Cobban et al. (COBBAN et al. Revisiting the pink-

red pigmented basidiomycete mirror yeast of the phyllosphere. *Microbiology Open*, v. 5, p. 846-855, 2016), *Sporobolomyces roseus* é agora reconhecido como *Sporidiobolus pararoseus*, uma espécie capaz de crescer em anaerobiose e reconhecida como um metabolismo facultativo. (ALI, A.H.; HIPKIN, C.R. Nitrate assimilation in the basidiomycete yeast *Sporobolomyces roseus*. *Journal of General Microbiology*, v. 131, p. 1867-1874, 1989; COBBAN 3et al. Revisiting the pink-red pigmented basidiomycete mirror yeast of the phyllosphere. *Microbiology Open*, v. 5, p. 846-855, 2016). A capacidade de crescimento em condições anaeróbicas é uma característica importante de uma cepa probiótica, uma vez que o rúmen dos animais está em um ambiente anaeróbico (ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 459 - 479, 2000).

[071] Exemplo experimental II - Culturas submersas de leveduras em ambiente aeróbio usando bagaço de cana em processo de Batelada simples. As culturas submersas em biorreatores demonstraram que *R. mucilaginosa* LABI1, *W. onychis* LABI2, *S. japonicus* Sia 70a, *S. pararoseus* Sia 33.1 e *S. cerevisiae* M26 foram capazes de crescer em meio contendo bagaço de cana (BC) como principal fonte de carbono na condição aeróbica. A fase de log terminou em 24 h para todas as leveduras. A cultura de *R. mucilaginosa* LABI1 (FSm) produziu a maior biomassa após cultivo, com 1,9 g/L ($1,1 \times 10^8$ células/mL), seguida por *S. pararoseus* Sia 33.1 (1,6 g/L e $1,6 \times 10^8$ células/mL) e *S. japonicus* Sia 70a (1,4 g/L e $6,0 \times 10^7$ células/mL). Embora *W. onychis* LABI2 tenha alcançado maior concentração de células que *R.*

mucilagínosa LABI1 ($1,6 \times 10^8$ células/mL), a produção de biomassa foi 2,1 vezes menor (0,9 g/L). Este resultado pode ser explicado pelo menor tamanho da primeira levedura quando comparada com a segunda na observação por microscopia. Quando o crescimento de todas as leveduras foi comparado, houve um crescimento muito menor para *S. cerevisiae* M26 (0,4 g/L de biomassa ou $3,0 \times 10^7$ células/mL) do que para as outras linhagens. Como *S. cerevisiae* não produz xilanases ou celulasas (LA GRANGE, D.C.; PRETORIUS, I.S.; CLAEYSSSENS, M.; VAN ZYL, W.H. Degradation of xylan to d-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger* β -xylosidase (xlnD) and the *Trichoderma reesei* Xylanase II (xyn2) Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 5512-5519, 2001) e a capacidade de assimilar outros carboidratos, como a xilose (ARORA, R.; BEHERA, S.; SHARMA, N.K.; KUMAR, S. A new search for thermotolerant yeasts, its characterization and optimization using response surface methodology for ethanol production. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-16, 2015; VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces Meyen ex Reess* (1870). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds). *The Yeasts - A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier, 2011. pp. 733-746), essas limitações metabólicas podem explicar o menor crescimento de *S. cerevisiae* no meio de cultura BC.

[072] Exemplo experimental II - Produção de enzimas fibrolíticas por leveduras especiais na batelada simples - Quanto à produção de enzimas fibrolíticas ficou comprovado que todas as quatro leveduras fibrolíticas apresentaram xilanases variando de 0,20 U/mL (*S.*

pararoseus), 0,29 U/mL (*R. mucilaginosus*), 0,30 U/mL (*W. onychis*) até 0,41 U/mL (*S. japonicus*). Já a cultura com a levedura *S. cerevisiae* só foi detectada 0,11 U/mL de xilanase, provavelmente devido ao próprio substrato (bagaço) pois esta linhagem não produz xilanasas. Portanto, verificou-se um maior crescimento celular em todas as leveduras fibrolíticas do que *S. cerevisiae* M26. Este fato pode ser atribuído à maior concentração de enzimas fibrolíticas secretadas, as quais são provavelmente responsáveis pela hidrólise dos resíduos, liberando açúcares fermentáveis que foram utilizados para o crescimento celular. A capacidade de crescimento em uma fonte de carbono lignocelulósico é uma habilidade desejada para microrganismos que atuarão para melhorar a digestão no rúmen como DFM ("Direct Fed Microbial") e por isso também são conhecidos como microrganismos probióticos. Nesse sentido, os resíduos lignocelulósicos requerem um pool de enzimas para sua hidrólise (SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 89, p. 246-291, 2005). As xilanasas são responsáveis pela hidrólise do componente xilano da hemicelulose, enquanto as celulasas atuam no componente celulósico dos materiais lignocelulósicos, liberando açúcares fermentáveis que podem ser utilizados para o crescimento e manutenção celular (ALPONTI, J.S.; FONSECA-MALDONADO, R.; WARD, R.J. Thermostabilization of *Bacillus subtilis* GH11 xylanase by surface charge engineering. International Journal of Biological Macromolecules, 2016).

Como o microrganismo precisa quebrar a hemicelulose e a celulose do bagaço de cana para liberar açúcares fermentáveis, essas atividades foram quantificadas durante todo o tempo de cultivo. As maiores quantidades de enzimas produzidas por *R. mucilaginosa* LABI1 em batelada simples e alimentada foram encontrados na faixa de 12 a 28 h e 24 a 48 h, respectivamente. Estes intervalos de tempo estão de acordo com a fase de log do crescimento das leveduras, portanto há uma demanda maior por fonte de carbono. A concentração de açúcares atingiu $0,68 \pm 0,03$ g/L (*R. mucilaginosa*), $0,22 \pm 0,03$ g/L (*W. onychis* LABI2), $0,38 \pm 0,03$ g/L (*S. japonicus* Sia 70a), $0,54 \pm 0,03$ g/L (*S. pararoseus* Sia 33.1) e $0,24 \pm 0,03$ g/L (*S. cerevisiae* M26). A produção de enzimas fibrolíticas por *S. japonicus* e *W. onychis* não foi encontrada na literatura para comparação. No entanto, *S. japonicus* produz fitases (KHANH, H.Q.; DUY, N.D.; HIEN, D.T.T.; VAN, T.P. Isolation and purification of extracellular phytase from *Sporobolomyces japonicas* (L9). Tap Chi Sinh Hoc, v. 34, n. 3SE, 2012), uma importante enzima amplamente utilizada em animais monogástricos para diminuir o efeito fitato e melhorar a digestibilidade do fósforo, cálcio, aminoácidos e outras fontes de energia (DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H.; PARTRIDGE, G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. Journal Science of Food and Agriculture, v. 95, p. 878-896, 2015). O uso de resíduos agroindustriais como alimento muitas vezes requer alguns pré-tratamentos, como o BC, e a adição de minerais, vitaminas, aminoácidos e outros compostos torna o processo

mais caro e menos viável (LIMA JR, D.M.; MONTEIRO, P.B.S.; RANGEL, A.H.N.; MACIEL, M.V.; OLIVEIRA, S.E.O. Sugarcane bagasse in ruminants nutrition. Revista Verde, v. 5, n. 2, p. 13 - 20, 2010; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresource Technology, v. 74, p. 69-80, 2000; SILVA, V.L.M.M.; GOMES, W.C.; ALSINA, O.L.S. Use of sugarcane bagasse as adsorbent biomass in the adsorption of organic pollutants. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007; YANG, X.; CHEN, H.; GAO, H.; LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. Bioresource Technology, v. 78, p. 277-280, 2001). No entanto, os tratamentos biológicos com microrganismos ajudam a melhorar as enzimas e os parâmetros nutricionais dos resíduos pelo processo de fermentação, que é responsável por uma fonte valiosa adicional de proteínas, vitaminas, ácidos e minerais, aumentando a digestibilidade e a palatabilidade. Em contraste com os pré-tratamentos químicos e físicos, as culturas biológicas também podem fornecer efeito probiótico no trato gastrointestinal animal e melhorar o desempenho e a produtividade animal (APÁS, A.L.; ARENA, M.E.; DRAKSLER, D.; GONZÁLEZ, S.N. Utilization of Sugarcane Industrial Residues as animal food and probiotic medium. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 106, n. 4, p. 363-367, 2008; LIMA JR, D.M.; MONTEIRO, P.B.S.; RANGEL, A.H.N.; MACIEL, M.V.; OLIVEIRA, S.E.O. Sugarcane bagasse in ruminants nutrition. Revista Verde, v. 5, n. 2, p. 13 - 20, 2010). Além disso, além dessas vantagens, o uso de resíduos como alimento também ajudaria

a resolver o problema de sua acumulação no meio ambiente (PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. Solid state fermentation: an alternative for the exploitation and valorization of tropical agroindustrial residues. Comunicado Técnico 102, v. 1, p. 1-5. 2005).

[073] Exemplo experimental II - Viabilidade celular e fonte nitrogenada na batelada simples - Outro aspecto importante foi a fonte de N, o meio formulado utilizado para culturas descontínuas continha 0,2% de extrato de levedura. Ocorre que esse nutriente é caro e nesta concentração utilizada é inviável economicamente. Assim no terceiro experimento já foi avaliada a substituição desse nutriente por outro mais econômico para uso industrial, o resíduo água de maceração de milho. A viabilidade de *S. cerevisiae* M26 foi a mais baixa no final da cultura, no entanto, a viabilidade celular foi alta (77%) para todas as linhagens de levedura no final da cultura, demonstrando as condições saudáveis para as leveduras neste bioprocessos. Este parâmetro indicou que não houve maiores inibidores na cultura, exceto a limitação de crescimento por fonte de carbono (bagaço de cana), que foi mais conveniente para as leveduras fibrolíticas do que *S. cerevisiae*. Outro aspecto a ser considerado é se o objetivo é maximizar a produção de biomassa microbiana com matéria-prima lignocelulósica. Neste caso, o pré-tratamento é necessário ou pelo menos parcialmente hidrólise da fibra para melhorar o crescimento de leveduras fibrolíticas. Mas se a ideia é usar esses microrganismos especiais como um pré-tratamento biológico de matéria-prima lignocelulósica, melhorar seu valor

nutricional e adicionar DFM, o tratamento termoquímico não é necessário, como exposto neste experimento, pois haverá um aumento no custo da matéria-prima.

[074] Exemplo experimental II - Composição química e minerais das células de leveduras - De acordo com a composição química das células, os componentes mais importantes na biomassa das leveduras são carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P). Embora as células de *S. pararoseus* Sia 33.1 contivessem a maior concentração de C (469,5 g / kg), houve as menores quantidades de N (50,9 g / kg) e potássio (K) (1,0 g / kg) em comparação com as outras espécies. *W. onychis* LABI2 tinha 393,0 g / kg de carbono, enquanto *R. mucilaginosa* LABI1 e *S. japonicus* Sia 70a continham 441,0 g / kg e 421,5 g / kg, respectivamente. O teor de fósforo foi o mesmo para todos os microrganismos testados (aproximadamente 15,0 g / kg). Se considerados os minerais apresentados em menor quantidade, *W. onychis* LABI2 demonstrou maior concentração de Mg (1,8 g / kg) enquanto *R. mucilaginosa* LABI1 apresentou maior concentração de S (3,97 g / kg). As concentrações de magnésio e enxofre de *S. pararoseus* Sia 33.1 foram as mais baixas entre as outras espécies (1,1 g / kg e 2,41 g / kg, respectivamente), embora manganês tenha sido a mais alta (0,31 g / kg) entre elas. As células *S. japonicus* Sia 70a demonstraram concentração de minerais semelhante em comparação aos demais microrganismos, com concentração de zinco ligeiramente mais alta (0,19 g/kg). Em comparação com a biomassa de *S. cerevisiae* com potencial para uso como proteína unicelular (Single Cell Protein - SCP), as células *R. mucilaginosa* LABI1, *W. onychis* LABI2, *S. pararoseus* Sia

33.1 e *S. japonicus* Sia 70a demonstraram maiores concentrações de manganês ($> 0,04$ g / kg) e zinco ($> 0,15$ g / kg), mas menores concentrações de nitrogênio, potássio e cálcio. As quantidades de fósforo e enxofre foram iguais ($p < 0,05$) para todas as espécies, incluindo *S. cerevisiae*. Além disso, a concentração de carbono foi maior para *S. pararoseus* Sia 33.1. O magnésio foi maior para *R. mucilaginoso* LABI1 (1,6 g / kg), *W. onychis* LABI2 (1,8 g / kg) e *S. japonicus* Sia 70a (1,6 g / kg). A concentração de cobre de *W. onychis* LABI2 (0,07 g / kg), *S. pararoseus* Sia 33,1 (0,09 g / kg) e *S. japonicus* Sia 70a (0,08 g / kg) também foi maior do que a biomassa de *S. cerevisiae* (0,05 g / kg).

[075] Exemplo experimental II - Enriquecimento nutricional do bagaço com o cultivo - Houve um grande enriquecimento proteico em Bagaço não-hidrolisado após as culturas de levedura. Segundo Neumann et al. (NEUMANN, M; UENO, R.K; PERUSSOLO, L.F.; GHELLER, L.F.M.; POZYNEK, M.; BARCELLOS, J.O.; BUMBIERIS JUNIOR, V.H. Introduction of sugar cane bagasse pellets in diets devoid of long fiber for feedlots finished steers. Semina: Ciências Agrárias, v. 37, n. 5, p. 3305-3316, 2016) o bagaço de cana-de-açúcar contém 1,8% de proteína bruta, 5,2% de cinzas e 46,6% de carboidratos, confirmando o baixo teor de proteína desse resíduo (PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresource Technology, v. 74, p. 69-80, 2000a). Esses valores estão próximos aos percentuais encontrados pelo presente trabalho (0,7% de extrato etéreo, 5,5% de cinzas, 48,6% de carboidratos com 8,7% de umidade).

O teor de proteína aumentou de 1,6% no bagaço antes da cultura para 3,1% (*R. mucilaginosa* LABI1), 4,0% (*W. onychis* LABI2), 4,7% (*S. japonicus* Sia 70a), 4,6% (*S. pararoseus* Sia 33.1) e 3,7% (*S. cerevisiae* M26. Além disso, essas concentrações de proteína não incluíam proteínas de biomassa de levedura, uma vez que foram separadas. Se considerado a soma de biomassa de células de levedura e massa do BC final, o conteúdo de proteína iria para 4,7% para *R. mucilaginosa* LABI1 e *W. onychis* LABI2, 6,2% para *S. japonicus* Sia 70a, 7,3% para *S. pararoseus* Sia 33.1 e 4,3% para *S. cerevisiae* M26, uma vez que a proteína na biomassa de leveduras foi de 20,5%, 19,2%, 26,2%, 39,2% e 28,1%, respectivamente.

[076] Exemplo experimental II - Enriquecimento proteico no processo de batelada simples. Como a *S. cerevisiae* é amplamente utilizada em rações e alimentos, outras espécies como *R. mucilaginosa*, *W. onychis*, *S. pararoseus* e *S. japonicus* demonstram a possibilidade de seu uso para o mesmo propósito ao considerar sua composição celular. Uma vantagem dessas espécies sobre *S. cerevisiae* é sua versatilidade no uso do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e a obtenção de alta concentração de biomassa. Alto teor de proteína, especialmente em *S. pararoseus* Sia 33.1 (39,2%), faz dessa levedura uma fonte valiosa de SCP ou proteína unicelular, com capacidade de conversão dos resíduos em proteína torna este bioprocesso muito valioso uma vez que o conteúdo de proteína do resíduo é melhorado. Assim, o cultivo destes microrganismos com resíduos agroindustriais resolve o problema do baixo teor de proteínas e fornece outros minerais essenciais na

composição da ração animal. A presença de minerais em quantidades maiores é importante, já que ao contrário de outros nutrientes, os minerais não podem ser sintetizados pelos organismos vivos e estão envolvidos em muitos aspectos do metabolismo celular, portanto estão intimamente relacionados às funções celulares (COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. *The cell: a molecular approach*. United States of America: Sinauer Associates Inc, 2003. 832p; ALTERTHUM, F. Elementos de microbiologia. In: SCHMIDELL et al (Eds). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. pp. 5-18). Além disso, se estas leveduras fibrolíticas podem crescer em um ambiente anaeróbico, se forem capazes de produzir enzimas fibrolíticas e usarem parte de uma fibra (bagaço), tornando a fibra residual mais enriquecida, especialmente em proteínas, tais resultados sugerem que essas leveduras se comportam como DFM ou leveduras probióticas no rúmen, o que pode ser muito benéfico para a saúde e nutrição do animal de produção.

[077] Exemplo Experimental II - Potencial Probiótico das leveduras fibrolíticas ou Direct Fed Microbial (DFM) - Trata-se de aditivos vivos ou linhagens especiais de microrganismos capazes de algumas habilidades importantes: modulação da imunidade, aumento da flora intestinal, competição com microrganismos patogênicos no trato gastrointestinal, produção de enzimas que auxiliam na degradação e digestibilidade da fibra alimentar, controle do pH e fornecimento dos compostos essenciais do hospedeiro. Outras habilidades são a tolerância no ambiente gástrico e a adesão na mucosa intestinal para excluir patógenos. (NEWBOLD et al. *Mode of action of the yeast Saccharomyces*

cerevisiae as feed additive for ruminants. British Journal of Nutrition, v. 76, n. 2, p. 249 - 261, 1996; VILLAS-BÔAS et al. Animal Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. Feed Science and Technology, v. 98, p. 1-12, 2002; KUMURA et al. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. Journal of Dairy Science, v. 87, 4050-4056, 2004; APÁS et al. Utilization of Sugarcane Industrial Residues as animal food and probiotic medium. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 106, n. 4, p. 363-367, 2008).

[078] Exemplo Experimental II - Potencial Probiótico das leveduras fibrolíticas ou Direct Fed Microbial (DFM)-Atividade Ruminal. No caso dos ruminantes, cuja fermentação ocorre em $\text{pH} > 6$, a produção de lactato leva a um aumento na acidez, o que reduz a eficiência da digestão ruminal. Assim, um dos efeitos causados pelos aditivos é a diminuição dessa produção, promovendo o crescimento de microrganismos que utilizam este lactato (FRANÇA, R.A.; RIGO, E.J. Utilization of alive yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) in ruminant nutrition - A review. FAZU, v. 8, p. 187-195, 2011). Entre os efeitos positivos dos probióticos estão a estimulação da microflora no rúmen, o aumento do crescimento de bactérias celulolíticas, que também aumenta a taxa de degradação e digestibilidade da fibra, a maior proteína total contida nas células de levedura e o controle do pH ruminal (NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J.; MCINTOSH, F.M. Mode of action of the yeast *Scchacaromyces cerevisiae* as feed additive for ruminants. British Journal of Nutrition, v. 76, n. 2, p. 249 - 261, 1996). Além disso, a produção de enzimas fibrolíticas é

importante para microrganismos probióticos, uma vez que aumentariam a digestibilidade dos alimentos (LACONI, S.; POMPEI, R. Study and characterization of intestinal yeasts of mullet (*Mugil spp.*) for potential probiotic use. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 5, p. 475 - 480, 2007).

[079] Exemplo Experimental II - Potencial Probiótico das leveduras fibrolíticas ou Direct Fed Microbial (DFM)-Atividade enzimática fibrolítica. A produção de enzimas degradadoras de xilana por *R. mucilaginosa* LABI1, *W. onychis* LABI2, *S. japonicus* Sia 70a e *S. pararoseus* Sia 33.1 traz um efeito benéfico no rúmen do animal, ajudando a degradar hemicelulose e aumentando a digestibilidade dos substratos. Além disso, testes de atividade celulolítica (CMCase) realizados por *R. mucilaginosa* LABI1 mostraram a presença de endoglucanases que são responsáveis pela quebra da fração de celulose do bagaço de cana-de-açúcar, contribuindo para um possível uso dessa espécie como DFM.

[080] Exemplo Experimental II - Potencial Probiótico das leveduras fibrolíticas ou Direct Fed Microbial (DFM)-Crescimento anaeróbico por leveduras probióticas. Devido à condição anaeróbia do ambiente gástrico dos animais, outra característica desejável para um microrganismo ser usado como DFM é a capacidade de crescer em um ambiente ausente de oxigênio (ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 459 - 479, 2000). Os resultados obtidos por este estudo através do cultivo em frasco anaeróbio demonstraram que todas as leveduras foram capazes de crescer aerobicamente, em baixa concentração de oxigênio e ambiente anaeróbico comprovando

ser microrganismos facultativos.

[081] Exemplo Experimental II - Potencial Probiótico das leveduras fibrolíticas ou Direct Fed Microbial (DFM)-inibição de outros microrganismos por leveduras probióticas. A inibição de outros microrganismos prejudiciais ao trato gastrointestinal também é um fator interessante quando se consideram microrganismos com propriedades probióticas (MARTINS et al Utilization of yeasts as probiotics. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 5, 2005). Libkind et al. (LIBKIND et al Rhodotorula mucilaginosa, a carotenoid producing yeast strain from a patagonian high-altitude lake. Folia Microbiology, v. 49, n. 1, p. 19-25, 2004) demonstraram o efeito Killer de R. mucilaginosa CRUB 0138 em células de Rhodosporidium kratochvilovae CRUB 0121 e R. mucilaginosa CRUB 0137. Este efeito é devido à produção de uma glicoproteína por algumas espécies de leveduras que inibe o crescimento de células sensíveis de outros microrganismos (GOLUBEV, W.I. Antagonistic interactions among yeasts. In: ROSA, C.A.; PETER, G. The Yeast Handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlim: Springer-Verlag, 2006. p.197-219) e mostra evidência de um antagonismo contra outras células microbianas. Além disso, os pigmentos produzidos por R. mucilaginosa foram capazes de inibir algumas espécies de bactérias resistentes aos antibióticos Alguns estudos demonstram o efeito antagônico de S. pararoseus contra Staphylococcus aureus e Escherichia coli (YOO et al. Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast Rhodotorula mucilaginosa AY-01. Process Biochemistry, v. 51, n. 4, p.

463-473, 2016); LACONI et al. Study and characterization of intestinal yeasts of mullet (*Mugil spp.*) for potential probiotic use. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 5, p. 475 - 480, 2007; SHARMA, R.N.; MAHARSHI, R.P.; GAUR, R.B. *Sporidiobolus pararoseus* Fell & Tallman - an antagonistic yeast with biocontrol potential. *Current Science*, v. 95, p. 1003-1004, 2008), *Monilinia fructicola*; JANISIEWICZ, W.J.; KURTZMAN, C.P.; BUYER, J.S. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast*, v. 27, p. 389-398, 2010), *Botrytis cinerea*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.* e *Fusarium fujikuroi*; HUANG, R.; CHE, H.J. ; ZHANG, J.; YANG, L.; JIANG, D.H.; LI, G.Q. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. *Biological Control*, v. 62, p. 53-63, 2012. Portanto, além de servir como fonte de proteínas, vitaminas, aminoácidos e minerais, algumas espécies forneceriam carotenóides benéficos ao hospedeiro. Outro aspecto é que o uso de Antibióticos como Promotores de Crescimento (AGPs) na alimentação animal para controlar bactérias patogênicas que podem ser transmitidas ao longo da cadeia alimentar é uma prática abolida desde janeiro de 2006 na União Européia em vista do surgimento de resistência microrganismos (GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 141, p. S15-S28, 2010; MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 105, p. 281-295, 2005). Então, a

necessidade de mais DFM está aumentando substituindo os aditivos AGPs.

[082] Exemplo experimental III - Culturas submersas de leveduras em ambiente aeróbio usando bagaço-de-cana no processo de Batelada Alimentada. O experimento de batelada alimentada foi realizado apenas com *S. cerevisiae* e *R. mucilaginosa* a fim de comparar as performances dos processos batelada simples com a batelada alimentada. O cultivo apresentou uma fase log mais curta que a batelada simples, terminando em 12 - 24 h para *R. mucilaginosa* LABI1 e em apenas 4 h para *S. cerevisiae* M26. Estas culturas utilizando bagaço de cana no meio de cultura em bioreator mudaram nutricionalmente o resíduo final não hidrolisado de bagaço após o crescimento. Para o cultivo das leveduras *R. mucilaginosa* e *S. cerevisiae*, o resíduo de bagaço não hidrolisado após o cultivo foi cerca de 72 a 80%, e teve uma mudança de: a) extrato etéreo aumentado de 0,7% para respectivamente 1,5-1,9%; b) cinzas diminuíram de 5,5% antes da cultura para 3,9 e 3,5% respectivamente, c) proteína bruta - aumento de 1,6% antes para 3,2 e 3,5%, respectivamente, d) fibras - aumento de 38,3% para 41 a 42 % e d) nutrientes digestivos totais de 48,6% para 50,7% e 51,6% respectivamente. Já a biomassa de levedura foi muito superior na *R. mucilaginosa* ($2,4 \times 10^8$ cel/ml ou 4,0 g/l) do que para *S. cerevisiae* ($0,4 \times 10^8$ cel./ml ou 2,2 g/l), o que reflete a menor facilidade da segunda em hidrolisar o bagaço de cana. Dados de rendimento celular também apontam para essa direção, com Yx/s de 0,2 g/g para *R. mucilaginosa*, contra Yx/s de 0,1 g/g para *S. cerevisiae*.

Viabilidade celular também foi maior para a primeira (91.3%) do que para a segunda (77,5%) revelando a maior afinidade de *R. mucilaginosa* para um meio cuja fonte de carbono é predominantemente composta por fibras (bagaço de cana). Foram detectadas as presenças de xilanases (0,19 a 0,31 U/ml) entre 0 e 24 horas de cultivo de *R. mucilaginosa* e carboximetilcelulase (ou CMCase - atividade endoglucanase) de 0,43 U/ml em 32 horas de cultivo. Já para o cultivo de *S. cerevisiae* foi detectada a presença de uma quantia bem inferior das duas enzimas: 0,07 a 0,11 U/ml de xilanase em intervalo de 0 a 24 horas de cultivo e 0 a 0,18 U/ml de CMCase entre 0 e 72 horas de cultivo. Entretanto, a biomassa de *R. mucilaginosa* possuiu menos proteína bruta (18,3%), resíduos mineral seco (5,7%) e extrato etéreo (0,7%) do que *S. cerevisiae* (respectivamente, 28,2%, 7,1% e 2,1%) neste processo de batelada alimentada, enquanto que houve maior teor de fibra na biomassa de *R. mucinaginosa* (5,8%) do que em *S. cerevisiae* (5,2%).

Disposições finais

[083] Nesta invenção está sendo proposto um tratamento biológico dos resíduos lignocelulósicos (tais como bagaço e palha de cana, talo e raízes de plantas, pó de serra e outros resíduos ricos em fibras), utilizando-se leveduras fibrolíticas que possuem enzimas específicas (celulases, xilanases e betaglucanases) capazes de promover a digestão parcial da fibra melhorando a digestibilidade da mesma e aumentando o teor de nutrientes através da propagação das células de leveduras numa parte deste material, com consumo de apenas cerca de 15 a 20 % da fibra.

[084] Para este tratamento biológico propõe-se um

cultivo que poderá ser feito através de bioprocessos com alimentação em batelada simples e/ou batelada alimentada e /ou processo contínuo, que consiste na mistura do agente catalizador, neste caso, um microrganismo com habilidades especiais e o meio de cultura num reator, também denominado fermentador, sob condições específicas de operação. Tal processo consegue converter fibras, açúcares e outros constituintes de resíduos e/ou outras moléculas orgânicas em biomassa microbiana altamente eficaz na produção de enzimas em geral e, em particular, enzimas fibrolíticas, o que possibilita a conversão microbiana dos carboidratos em proteínas e outras moléculas orgânicas de interesse nutricional tanto para a saúde animal como humana.

[085] Com o bioprocesso proposto, espera-se além da produção de enzimas fibrolíticas e microrganismos vivos probióticos ou "Direct Fed Microbial" - DFM, também a produção de proteína microbiana ou "Single Cell Protein" de baixo custo, tendo em vista que não há necessidade de utilizar carboidratos mais caros, tais como sacarose ou glicose, mas sim fibras a partir de resíduos (que são muito mais baratas) para conversão em proteínas e/ou aminoácidos. Utilizando-se o processo proposto, obtém-se enriquecimento proteico e de outros nutrientes, além do aumento da digestibilidade da fibra residual que consiste nas partículas sólidas filtradas após o processo fermentativo, as quais aumentam substancialmente os nutrientes, em especial, a proteína e os minerais. Também é possível via centrifugação, a obtenção da biomassa microbiana viva ou morta, e com níveis de proteína bem mais elevados que na fração sólida residual obtida após separação por filtração.

[086] Dentre os microrganismos com habilidade fibrolítica, ou seja, produtores de enzimas extracelulares tais como xilanases, celulasas, betaglicosidases e oxidases capazes de degradar fibras lignocelulósicas, destacam-se as leveduras de diversos gêneros tais como *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Wickerhamomyces*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Pichia*, *Hansenula*, *Geotrichum*, *Paecilomyces*, *Wickerhamomyces*. Neste documento foram realizados experimentos com algumas linhagens tais como *Wickerhamomyces onychis* LABI2, *Sporobolomyces japonicus* Sia 70a, *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1 *Rhodotorula mucilaginosa* LABI1 e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* M26, como controle. Com isso, ficou evidente as vantagens dos microrganismos fibrolíticos em relação aos não fibrolíticos, para a produção dos produtos de interesse citados aqui.

[087] O bioprocesso poderá ser operado com ou sem reciclo de células e como mosto ou meio de cultura formulado com nutrientes de uso comum tais como sais minerais, açúcares (glicose, sacarose, xilose, etc) fonte de nitrogênio orgânico tais como ureia, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos em diferentes graus de pureza. Alternativamente, o meio de cultivo poderá ser feito a base de resíduos, tais como resíduos alimentares, resíduos do processamento da madeira, tais como pó de serra, gravetos etc, resíduos agroindustriais tais como bagaço de mandioca, bagaço de cana, água de maceração de milho, e resíduos agrícolas, tais como talo de plantas, palha, casca e sementes, em diferentes concentrações (0,1 a 50%, preferencialmente de 0,5 a 15%). O mosto deve ser

convenientemente preparado com água e ajustado o pH (2,0 a 7,0, preferencialmente de 4,0 a 6,5) ou não dependendo da necessidade. A esterilização ou pasteurização do mosto não é imprescindível mas conveniente.

[088] Com o cultivo proposto, a fibra (bagaço ou palha de cana ou talo de plantas ou outras partes) a qual integra o meio de cultivo como fonte de carbono, não é totalmente hidrolisada, sobrando ao final do processo cerca de 70 a 90%, evidentemente que se adicionar menos fibras ou mais fibras teremos uma fibra residual menor ou maior. Esta fibra residual não só é mais digerível, mais nutritiva (maior teor de nutrientes caros como proteínas e vitaminas), mais palatável, mas também já conterá a presença de leveduras probióticas ativas, que irão colaborar no equilíbrio e performance do intestino do animal, no caso dos ruminantes, o rumem, com consequente aumento da eficiência no processo de digestão. Com isso, o animal se torna mais sadio, aumenta o ganho de peso e evita doenças, sem a necessidade de administrar os antibióticos em subdosagem, hoje prática abolida nos principais mercados mundiais.

[089] Essa maior eficiência digestiva é acompanhada de menores custos com a formulação das rações, tendo em vista que há um aumento substancial no teor proteico e de outros nutrientes, que irão contribuir para maior conversão de proteína vegetal ou microbiana em proteína animal, além de menores custos operacionais.

[090] Alternativamente, as leveduras com características probióticas ou aditivos microbianos para melhoria da digestibilidade e, consequente melhora da

nutrição, também conhecidos como "Direct Fed Microbial" ou DFM, podem ser separadas, secas e comercializadas de forma independente dos resíduos, tanto para a nutrição animal como humana.

[091] Portanto a tecnologia proposta pode ser aplicada tanto num ambiente industrial (fábricas de insumos ou ração) com produção de produtos mais puros tais como os DFM, enzimas, quanto em fazendas ou propriedades agrícolas menores, ou mesmo em cooperativas agrícolas, com produção de misturas destes produtos associados às fibras de diversas naturezas, aqui já explicitadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de leveduras probióticas e enriquecimento nutricional de resíduos para benefício à saúde humana e animal, caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

A) Cultivo de microrganismos fibrolíticos, em especial, leveduras fibrolíticas, em meios formulados com resíduos lignocelulósicos podendo conter outros tipos de materiais tais como amido, proteína, lipídeos, dentre outros e com bioprocessos aerados ou não, e com forma de alimentação de substrato em batelada simples, batelada alimentada ou processo contínuo; e

B) Após cultivo, a fibra não totalmente digerida pode ser separada da parte líquida por filtração e/ou centrifugação, e a levedura produzida então separada por centrifugação e ambas frações utilizadas para consumo animal, e ainda a fração contendo a biomassa podendo ser usada também para alimentação humana, após secagem ou consumida úmida, sendo a fração fibrosa utilizada como volumoso para alimentação animal e fonte complementar de proteína, sais e outros nutrientes e a fração da biomassa de levedura podendo ser utilizada como aditivo probiótico na alimentação humana ou animal.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa A está sendo proposto um tratamento biológico do cultivo de resíduos lignocelulósicos (tais como bagaço e palha de cana, talo e raízes de plantas, pó de serra e outros resíduos ricos em fibras), utilizando-se leveduras fibrolíticas que possuem enzimas específicas (celulases e xilanases) capazes de

promover a digestão parcial da fibra melhorando a digestibilidade da mesma e aumentando o teor de nutrientes através da propagação das células de leveduras numa parte deste material, com consumo de apenas cerca de 15 a 20% da fibra.

3. Processo, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de ser operado com ou sem reciclo de células e como mosto ou meio de cultura formulado com nutrientes de uso comum tais como sais minerais, açúcares (glicose, sacarose, xilose, etc) fonte de nitrogênio orgânico tais como ureia, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos em diferentes graus de pureza, ou alternativamente, o meio de cultivo podendo ser feito à base de resíduos, tais como resíduos alimentares, resíduos do processamento da madeira, tais como pó de serra, gravetos etc, resíduos agroindustriais tais como bagaço de mandioca, bagaço de cana, água de maceração de milho, e resíduos agrícolas, tais como talo de plantas, palha, casca e sementes, em diferentes concentrações (0,1 a 50%, preferencialmente de 0,5 a 15%), sendo ainda o mosto (meio de cultura) convenientemente preparado com água e ajustado o pH (2,0 a 7,0, preferencialmente de 4,0 a 6,5) ou não dependendo da necessidade, sendo a esterilização ou pasteurização do mosto não imprescindível, mas conveniente.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa A compreender tratamento biológico de cultivo que poderá ser feito através de bioprocessos com alimentação em batelada simples e/ou batelada alimentada e /ou processo contínuo, que consiste na mistura do agente catalizador, neste caso, um

microrganismo com habilidades especiais e o meio de cultura num reator, também denominado fermentador, sob condições específicas de operação.

5. Processo, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pelo fato de que tal processo consegue converter fibras, açúcares e outros constituintes de resíduos e/ou outras moléculas orgânicas em biomassa microbiana eficaz na produção de enzimas em geral e, em particular, enzimas fibrolíticas, o que possibilita a conversão microbiana dos carboidratos em proteínas e outras moléculas orgânicas de interesse nutricional tanto para a saúde animal como humana.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo da etapa A envolver uso de biocatalizadores dessa reação biológica, os quais consistem principalmente de: microrganismos com habilidade fibrolítica, ou seja, produtores de enzimas extracelulares tais como xilanases, celulasas, betaglicosidases, oxidases dentre outras capazes de degradar fibras lignocelulósicas, destacam-se as leveduras de diversos gêneros tais como *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Pichia*, *Hansenula*, *Geotrichum*, *Paecilomyces*, *Wickerhamomyces*, destacando ainda os experimentos feitos com as linhagens *Wickerhamomyces onychis* LABI2, *Sporobolomyces japonicus* Sia 70a, *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1, *Rhodotorula mucilaginosa* LABI1 e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* M26, como controle.

7. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato da produção de enzimas fibrolíticas

e microrganismos vivos probióticos ou "Direct Fed Microbial" - DFM, também a produção de proteína microbiana ou "Single Cell Protein" de baixo custo, tendo em vista que não há necessidade de utilizar carboidratos mais caros, tais como sacarose ou glicose, mas sim fibras a partir de resíduos baratos para conversão em proteínas e/ou aminoácidos.

8. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de garantir a partir do cultivo proposto, que a fibra, do bagaço ou palha de cana ou talo de plantas ou outras parte a qual integra o meio de cultivo como fonte de carbono, não necessariamente precisa ser totalmente hidrolisada, podendo sobrar ao final do processo cerca de 70 a 90%.

9. Produto obtido, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de ser fibra residual mais digerível, mais nutritiva (maior teor de nutrientes caros como proteínas e vitaminas) e contendo leveduras probióticas ativas, que além de aumentar palatabilidade, irão colaborar no equilíbrio e performance do intestino do animal, no caso dos ruminantes, o rumem, com consequente aumento da eficiência no processo de digestão. Com isso, o animal se torna mais sadio, aumenta o ganho de peso e evita doenças, sem a necessidade de administrar os antibióticos em subdosagem, hoje prática abolida nos principais mercados mundiais.

10. Produto obtido, de acordo com as reivindicações 8 e 9, caracterizado pelo fato de ser fibra residual com maior eficiência digestiva, acompanhada de menores custos com a formulação das rações, tendo em vista que há um aumento

substancial no teor proteico e de outros nutrientes, que irão contribuir para maior conversão de proteína vegetal ou microbiana em proteína animal, além de menores custos operacionais.

RESUMO**Processo de obtenção de leveduras probióticas e enriquecimento nutricional de resíduos para benefício à saúde humana e animal**

A presente invenção se insere no campo da microbiologia e nutrição animal, mais particularmente dentro do campo da aplicação de microrganismos especiais na conversão de resíduos em compostos nutricionais e melhoria das rações e nutrição animal. Nesta invenção foi demonstrado um tratamento biológico dos resíduos lignocelulósicos utilizando-se leveduras fibrolíticas capazes de promover a digestão parcial da fibra, melhorando a digestibilidade da mesma e aumentando o teor de nutrientes por meio da propagação das leveduras e consumo parcial da fibra. Desta forma foi provado: a) o crescimento destas leveduras em meios de cultura baratos e na ausência de oxigênio, b) produção de 20 aminoácidos (exceto W. onychis LABI2), c) produção de xilanases e celulasas d) composição química das favorável à nutrição animal d) hidrólise lignocelulósica parcial aumentando os nutrientes digestíveis totais. Esses resultados indicam o uso destas leveduras na alimentação animal, como probióticos a fim de aumentar a performance ruminal, e na conversão e enriquecimento nutricional de fibras usadas na composição das rações, tornando-as mais baratas e eficientes na conversão animal.

São reivindicados os processos de obtenção das leveduras, os produtos obtidos e usos dos mesmos.