

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2011.07.13	(73) Titular(es): ALGICEL - BIOTECNOLOGIA E INVESTIGAÇÃO, LDA.
(30) Prioridade(s):	RUA DO LORETO, Nº 9, APT. 55, FAJÃ DE BAIIXO 9500-452 PONTA DELGADA PT
(43) Data de publicação do pedido: 2013.01.14	(72) Inventor(es): GONÇALO CRISTÓVÃO FURTADO TEIXEIRA DA MOTA PT LUÍS FILIPE CHAVES MEDEIROS TEVES PT
(45) Data e BPI da concessão: 2013.10.22 205/2013	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA PT RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE PRODUÇÃO À ESCALA INDUSTRIAL DE ASTAXANTINA A PARTIR DE MICROALGAS PRODUTORAS DE ASTAXANTINA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO AQUI DESCRITA RESPEITA À OPTIMIZAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA DE UMA MICROALGA PRODUTORA DE ASTAXANTINA, EM PARTICULAR UMA MICROALGA DO GÉNERO HAEMATOCOCCUS, E MAIS EM PARTICULAR HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS, E DE ASTAXANTINA, QUANDO ESTA É CULTIVADA EM FOTOBIOREACTOR FECHADO TIPO BUBBLE COLUMN, ATRAVÉS DE UM NOVO MÉTODO, AQUI DENOMINADO REGRESSIVO NA MEDIDA EM QUE PARTINDO DE UM PEQUENO VOLUME DE MEIO INOCULADO, VÃO SENDO INOCULADOS REACTORES SUCESSIVAMENTE DE MAIORES DIMENSÕES, E POSTERIORMENTE, O PROCESSO INVERTE-SE, TRANSFERINDO-SE O MEIO INOCULADO PARA REACTORES SUCESSIVAMENTE MAIS PEQUENOS, OPTIMIZANDO POR ESTA VIA A PENETRAÇÃO DE RAIOS SOLARES E POR CONSEQUÊNCIA INCREMENTANDO OS PROCESSOS FISIOLÓGICOS DA MICROALGA QUE INDUZEM MAIOR MULTIPLICAÇÃO VEGETATIVA, BEM COMO DE PRODUÇÃO DE CAROTENOS TOTAIS, ONDE SE INCLUI A ASTAXANTINA.

RESUMO

"Processo de produção à escala industrial de astaxantina a partir de microalgas produtoras de astaxantina"

A invenção aqui descrita respeita à optimização da produtividade de biomassa de uma microalga produtora de Astaxantina, em particular uma microalga do género *Haematococcus*, e mais em particular *Haematococcus pluvialis*, e de Astaxantina, quando esta é cultivada em fotobioreactor fechado tipo *bubble column*, através de um novo método, aqui denominado "*Regressivo*" na medida em que partindo de um pequeno volume de meio inoculado, vão sendo inoculados reactores sucessivamente de maiores dimensões, e posteriormente, o processo inverte-se, transferindo-se o meio inoculado para reactores sucessivamente mais pequenos, optimizando por esta via a penetração de raios solares e por consequência incrementando os processos fisiológicos da microalga que induzem maior multiplicação vegetativa, bem como de produção de carotenos totais, onde se inclui a Astaxantina.

DESCRIÇÃO

"Processo de produção à escala industrial de astaxantina a partir de microalgas produtoras de astaxantina"

Objecto da Invenção

A invenção aqui descrita respeita à optimização da produtividade de biomassa de uma microalga produtora de Astaxantina do género *Haematococcus*, e mais em particular *Haematococcus pluvialis*, e de Astaxantina, quando esta é cultivada em fotobioreactor fechado tipo *bubble column*, através de um novo método, aqui denominado "Regressivo" na medida em que partindo de um pequeno volume de meio inoculado, vão sendo inoculados reactores sucessivamente de maiores dimensões, e posteriormente, o processo inverte-se, transferindo-se o meio inoculado para reactores sucessivamente mais pequenos, optimizando por esta via a penetração de raios solares e por consequência incrementando os processos fisiológicos da microalga que induzem maior multiplicação vegetativa, bem como de produção de carotenos totais, onde se inclui a Astaxantina.

Estado da Técnica

A identificação de diversas substâncias sintetizadas por microalgas (e.g. ácidos gordos poliinsaturados, carotenóides, ficobilinas, polissacáridos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioactivos naturais, como sejam os antioxidantes) tem incrementado o interesse no potencial biotecnológico destes organismos com vista à respectiva aplicação comercial em áreas distintas como nutrição, saúde humana e animal, tratamento de águas residuais, produção de energia e obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentar, química e farmacêutica, entre outras. Recentemente tem incrementado o interesse da utilização destes organismos na produção de antioxidantes e consequentemente tem-se investido no aperfeiçoamento da tecnologia de cultivo que garanta uma produção intensiva de biomassa algal e a sintetização do carotenóide vermelho de alto valor comercial, a Astaxantina natural.

A Astaxantina é uma xantofila muito valorizada, utilizada como suplemento alimentar, tanto para humanos como para animais sobretudo para a aquacultura. Este composto é produzido com fins comerciais tanto a partir de fontes naturais e sintéticas. Actualmente a fonte primária de maior potencial para a obtenção de Astaxantina é a microalga *Haematococcus pluvialis*.

Esta microalga é convencionalmente cultivada em dois estágios. Num primeiro estágio, denominado "verde", são fornecidas às células altas concentrações de nutrientes, (Azoto, Potássio, Fósforo, CO₂, etc.) para promover a sua multiplicação vegetativa e num estágio subsequente, denominado "vermelho", as células são privadas de nutrientes e expostas a luz intensa e concomitantemente sujeitas a *stress* salino através da adição de sais, por forma a induzir o seu enquistamento, durante o qual a microalga produz altos níveis de Astaxantina como medida de protecção contra o *stress* ambiental. É nesta fase que ocorre a colheita e posterior desidratação.

A tecnologia da produção de microalgas em fotobioreactores ainda não está consolidada, não existindo fornecedores deste tipo de equipamentos que garantam a respectiva fiabilidade e produtividade em explorações de grande dimensão. A oferta, limita-se à produção de fotobioreactores para uso à escala laboratorial e escala piloto. Os fotobioreactores clássicos são cilíndricos, verticais ou horizontais, em placas verticais e em manga plástica.

Existem explorações em diferentes pontos do globo para a produção de Astaxantina a partir de microalgas onde se utilizam distintos métodos. Uma das metodologias consiste no cultivo das microalgas em dois estágios com recurso a fotobioreactores de metacrilato (acrílico) cilíndricos horizontais e em painel, ambos com 5 cm de diâmetro e largura respectivamente (Claude Aflalo, *et al.*, 2007, Biotechnology and Bioengineering). São também utilizados os chamados *open ponds* que se caracterizam por reservatórios abertos de pequena profundidade, normalmente de 20cm onde pelo recurso a

pás se induz movimento ao meio (Bao Yu Zhang, *et al*, 2009, Elsevier B.V.).

Existem ainda os sistemas mistos que combinam uma fase vegetativa (verde) em fotobioreactor fechado seguida de uma fase de indução (vermelha) em *open pond*.

São também utilizados, por um fabricante, reactores semiesféricos, com diâmetros que rondam 1m e que permanecem elevados do solo através de um suporte.

O processo de produção de Astaxantina a partir da microalga *Haematococcus pluvialis* é objecto de múltiplos estudos. Destes estudos surgiu uma ideia alternativa, designadamente a utilização de reactores de camada dupla que permite o cultivo na fase vegetativa em simultâneo com a acumulação de astaxantina e diferentes zonas do reactor (Soo Suh *et al*, 2006, Elsevier).

Regra geral o método utilizado para provocar a indução da enquistação das células e consequente produção de astaxantina é a exposição à radiação luminosa natural ou artificial, o *stress* salino, mas também a refrigeração e posterior recuperação da temperatura ambiente, considerado como uma forma de acelerar o processo, e apenas então, a exposição à radiação.

No entanto, todos estes processos ou métodos de fabrico em larga escala supõem inúmeras desvantagens. Nomeadamente, o cultivo das microalgas em reservatórios abertos é muito susceptível a contaminações e de difícil controlo das condições de cultivo, factores determinantes para a boa produtividade. Os processos em fotobioreactor fechado também não têm correspondido em termos de rendimento/custos, muito devido à necessidade de equipamentos de grandes dimensões para se obter uma rendibilidade aceitável. A requerida grande dimensão dos fotobioreactores tem implicações negativas tanto em termos de custos de equipamento e de operação, como de exequibilidade. Se por um lado a excessiva dimensão dos reactores implica dificuldades de manipulação como por exemplo na limpeza do equipamento entre ciclos, a necessidade de grandes áreas afectas à operação, e consequente aumento de

custos, por outro lado, este aumento de escala prejudica invariavelmente a produção de biomassa e a produção de astaxantina pelas microalgas que dependem grandemente das condições de cultivo, especialmente da iluminação através do meio de cultivo.

Subsiste assim no estado da técnica a necessidade de um novo processo que optimize a produção da astaxantina a partir das microalgas e seja eficiente à escala industrial. É um tal método que os presentes inventores desenvolveram e que constitui a presente invenção.

Sumário da invenção

A presente invenção refere-se a um novo processo de produção em larga escala de microalgas produtoras de astaxantina do género *Haematococcus* e mais em particular *Haematococcus pluvialis*, a um processo de produção de um produto contendo astaxantina produzida por essas microalgas e a um processo de produção de astaxantina produzida por essas microalgas. Refere-se ainda ao produto contendo astaxantina e à astaxantina produzidos por esses processos.

Descrição das Figuras

Nas Figuras 1 e 2 anexas ilustra-se um exemplo de concretização específico e preferido da invenção. A Figura 1 representa um quadro sinóptico e a Figura 2 representa um diagrama de fases de um processo de produção de astaxantina à escala industrial pelo método regressivo da invenção, em que

Na fase 1, realizada "indoors",

- A tubo de ensaio
- B balão de erlenmeyer
- C fotobioreactor de D= 100 mm
 - C1 a 25% do volume
 - C2 a 50% do volume
 - C3 a 100% do volume
- D fotobioreactor de D= 250 mm
 - D1 a 25% do volume
 - D2 a 50% do volume
 - D3 a 100% do volume

Na fase 2, realizada "outdoors",

- E fotobioreactor de D= 400 mm
 - E1 a 25% do volume
 - E2 a 50% do volume
 - E3 a 100% do volume
- F fotobioreactor de D= 250 mm
- G fotobioreactor de D= 100 mm
 - G1 fotobioreactor G antes do enquistamento
 - G2 fotobioreactor G após o enquistamento
- H colheita/separação,
 - H1 autofloculação
 - H2 centrifugação
- I desidratação (estufa ou secador por pulverização ("spray drier"))
- J embalagem
- K compressor
- CO₂ dióxido de carbono gasoso
- 1 água esterilizada
- 2 MES-Volvox-medium
- 3 fertilizantes comerciais
- 4 acetato de sódio
- 5 fase líquida obtida da separação do meio de cultivo
- 6 biomassa obtida da separação do meio de cultivo

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção refere-se a um processo de produção em larga escala de microalgas produtoras de astaxantina do género *Haematococcus*, e mais particularmente *Haematococcus pluvialis*. Refere-se ainda a um processo de produção de astaxantina em larga escala a partir de microalgas produtoras de astaxantina do género *Haematococcus*, e mais particularmente *Haematococcus pluvialis*. Refere-se ainda a um produto contendo astaxantina obtido pelo novo processo de produção de astaxantina a partir de microalgas produtoras de astaxantina e à astaxantina assim produzida.

O novo processo da presente invenção consiste na produção de um inóculo da microalga, na sua cultura em larga escala numa sequência de fotobioreactores fechados de dimensões sucessivamente crescentes até à obtenção de um máximo de crescimento da microalga (biomassa) e posterior passagem para uma sequência de fotobioreactores fechados de dimensões sucessivamente decrescentes até à obtenção de um novo máximo de crescimento da microalga (biomassa).

A presente invenção refere-se também a um processo de produção em larga escala de astaxantina a partir de microalgas do género *Haematococcus*, mais particularmente *Haematococcus pluvialis*, compreendendo o cultivo das microalgas através do novo processo de produção de microalgas da invenção, e adicionalmente induzindo o enquistamento das microalgas no fotobioreactor fechado de menores dimensões.

A indução da produção de astaxantina pelas microalgas é efectuada nos fotobioreactores de menores dimensões, seguindo-se a recolha e processamento do produto obtido contendo astaxantina e eventual extracção e/ou purificação da astaxantina assim produzida.

Numa concretização do novo processo da presente invenção, a produção em larga escala da microalga produtora de astaxantina em fotobioreactores fechados é efectuada em sequências de fotobioreactores verticais, numa primeira fase de diâmetros sucessivamente crescentes até à obtenção de um máximo de crescimento da microalga e numa segunda fase de diâmetros sucessivamente decrescentes até à obtenção de um novo máximo de crescimento da microalga. Nesta segunda fase efectua-se a indução da produção de astaxantina pelas microalgas por *stress* salino no fotobioreactor de menores dimensões, seguindo-se a recolha e processamento do produto obtido contendo astaxantina por meios usuais, por exemplo por autofloculação, centrifugação, filtração e desidratação e eventual extracção e/ou concentração da astaxantina assim produzida, também por meios usuais, por exemplo pelo método "Extracção com Dióxido de Carbono Supercrítico".

O número e a dimensão dos fotobioreactores em cada fase não é crítico, estando limitados apenas por factores práticos

como as condições do inóculo, facilidade de homogeneização do meio, etc. Prefere-se no entanto na presente invenção utilizar uma primeira sequência de três dimensões de fotobioreactores verticais, p.ex. de 100, 250 e 400 mm de diâmetro respectivamente, e, na fase regressiva, uma segunda sequência de duas dimensões de fotobioreactores verticais, p.ex. de 250 e 100 mm respectivamente. Estas dimensões permitem a produção em escala industrial e a optimização do ciclo luz/escuro (*light/dark*) atendendo às densidades celulares em cada fase. Este modelo de fotobioreactor facilita o processo de inoculação minimizando a necessidade de inóculo produzido em laboratório.

Assim, numa concretização preferida do novo processo da presente invenção, a produção em larga escala da microalga produtora de astaxantina em fotobioreactores fechados é efectuada em fotobioreactores verticais, numa primeira fase numa sequência três dimensões sucessivamente crescentes de fotobioreactores, de aproximadamente 100 mm, 250 mm e 400 mm de diâmetro, respectivamente, até à obtenção de um máximo de crescimento da microalga e, numa segunda fase numa sequência de duas dimensões sucessivamente decrescentes de fotobioreactores, de aproximadamente 250 mm e 100 mm de diâmetro, até à obtenção de um novo máximo de crescimento da microalga. Nesta segunda fase efectua-se a indução da produção de astaxantina pelas microalgas por indução de *stress* salino no fotobioreactor de menores dimensões, seguindo-se a recolha e processamento do produto obtido contendo astaxantina por meios usuais, por exemplo por autofloculação, centrifugação, filtração e desidratação e eventual extracção e/ou concentração da astaxantina assim produzida, também por meios usuais, por exemplo pelo método de "Extracção com Dióxido de Carbono Supercrítico".

O tempo de cultivo em cada fotobioreactor, ou seja o momento da passagem para o fotobioreactor seguinte, não é crítico sendo determinado pelos factores práticos que permitem obter o máximo de crescimento de biomassa nesse fotobioreactor. Prefere-se no entanto dar início à fase de "regressão" do processo da invenção, ou seja a primeira trasfega de meio para fotobioreactor de dimensões inferiores, quando se atinge uma concentração em peso seco entre 0,35 g/L

e 0,48 g/L, tipicamente ao 13º dia de cultivo; e proceder a nova trasfega para fotobioreactor de dimensões inferiores quando se atinge uma concentração em peso seco entre 0,8 g/L e 1,1 g/L, tipicamente ao 20º dia de cultivo.

A indução de enquistamento das microalgas (produção de astaxantina) no fotobioreactor de menores dimensões é preferivelmente efectuada por adição de acetato de sódio a 2,5 g/L de meio, tipicamente ao 22º dia de cultivo.

A colheita e separação da biomassa contendo carotenóides, em particular astaxantina, a partir do meio de cultivo efectua-se tipicamente entre o 29º e 32º dia de cultivo, quando se atinge uma densidade entre 2 e 2,6 g/L (peso seco) e uma concentração de carotenóides entre 3 e 4,8%.

O processo da invenção permite assim obter produtividades na ordem de cerca de 2 a 2,6 g/L de biomassa (peso seco) e concentrações de carotenóides (maioritariamente astaxantina) entre cerca de 3 e 4,8%.

O aspecto diferenciador deste método consubstanciado na regressão, isto é na evolução no sentido da maior dimensão dos reactores e posterior involução para reactores menores, permite otimizar diversos parâmetros de crescimento, mormente a penetração da radiação solar, o que permite incrementar não só a multiplicação celular como também o incremento da concentração de carotenóides totais e consequentemente de Astaxantina nas células. Esta solução nunca foi antes tentada ou sequer sugerida.

Na produção de microalgas produtoras de astaxantina, em particular da microalga *H. pluvialis*, por métodos convencionais é efectuada uma diluição sucessiva de modo a contrariar o aumento da densidade óptica do meio provocado pelo aumento da concentração de biomassa, que impede a penetração de luz no meio e impede o bom crescimento das microalgas e a sua produção de astaxantina. Esta diluição, contudo, limita a produtividade dos processos de produção em larga escala uma vez que requer a manipulação de volumes crescentes de meio que se torna extremamente difícil e

eventualmente impraticável, dadas as dimensões requeridas para o equipamento, nomeadamente em fotobioreactores fechados.

Os presentes inventores desenvolveram um novo processo, aqui denominado "Processo de Regressão" em que obviam a necessidade de diluição do meio através da utilização de uma sequência de fotobioreactores de dimensões sucessivamente menores, permitindo o prosseguimento da fase de crescimento das microalgas para além do que é geralmente praticável (em fotobioreactores fechados convencionais) com conseqüente melhoria da produtividade em biomassa e em produção de astaxantina.

Os presentes inventores verificaram que a utilização de uma sequência de fotobioreactores de dimensões decrescentes, permite contrariar de modo eficaz o efeito do aumento da densidade óptica do meio de cultura ao longo do crescimento algal, com a conseqüente dificuldade de penetração da luz, sem necessidade de diluição do meio, obviando assim as dificuldades inerentes à manipulação de grandes volumes de meio, tanto em termos de custos e concepção de equipamento como de área afecta à produção e outras desvantagens da diluição como a possibilidade de contaminação, conseguindo assim uma optimização do crescimento das microalgas e da produção de carotenóides, em particular astaxantina, pelas microalgas.

É assim, através do processo da invenção, optimizada a produção de biomassa algal e de astaxantina produzida pela microalga sendo possível a operação no exterior ("*outdoors*") com utilização de apenas iluminação natural e equipamento de dimensões exequíveis, com bom controlo de contaminação e racionalização da área afecta à produção por um melhor aproveitamento do solo, obtendo-se superiores rendimentos.

Este método traz diversas melhorias, designadamente a optimização do aproveitamento do solo, dado que com reactores cilíndricos verticais se consegue numa mesma área cultivar maiores volumes do que com qualquer outro dos sistemas actualmente utilizados. Permite um bom controlo de contaminações e um excelente arejamento. A inoculação de cada

reactor permite flexibilidade pois não são necessárias grandes quantidades de inóculo, contrariamente por exemplo aos reactores cilíndricos horizontais. Relativamente a estes reactores existe ainda uma outra vantagem, designadamente a maior facilidade da operação de limpeza e desinfecção dado o melhor acesso que se tem a um reactor com 2000 mm de altura comparativamente a um reactor que pode atingir centenas de metros que incluem curvas e uniões.

Por outro lado não é necessário fazer nenhuma operação em *open pond* (lago ou tanque), que implicam necessariamente perdas de rendimento e fortes contaminações.

Para melhor compreensão do processo da invenção, descreve-se agora uma sua concretização particular a título de exemplo, também representada nas figuras 1 e 2 anexas.

EXEMPLO DE UMA CONCRETIZAÇÃO PREFERIDA

Segue-se um exemplo de uma concretização preferida do presente invenção, o qual é apresentado a título ilustrativo e não limitativo do âmbito da invenção tal como definido nas reivindicações.

1ª fase - Produção de inóculo em laboratório

A microalga utilizada para inóculo neste exemplo é a *Haematococcus pluvialis* proveniente da UTEX. A intensidade da luz é mantida entre 4000 a 10 000 lux durante 24 h, e a temperatura ambiente entre 23 e 27 °C; todo o ar fornecido ao sistema para agitação, desgasificação, transferência de massa e controlo do ciclo *light/dark* deve ser filtrado com filtros HEPA de modo a evitar contaminação do meio; a sala afecta à produção de inóculo deve ser mantida em excelentes condições de salubridade; e meio de cultura deve ser sempre autoclavado; toda a água fornecida ao meio deve ser previamente esterilizada; o inóculo inicial é mantido em agar em frigorífico à temperatura de 8°C; todos os utensílios, condutas e fotobioreactores devem ser sempre lavados com água corrente, desinfectados com, por exemplo, hipoclorito de sódio e enxaguados. O meio de cultura é MES-Volvox-medium, que num tubo de ensaio é inoculado com *Haematococcus*

pluvialis a partir de meio em agar-agar. O tubo é agitado duas vezes por dia. Passados cinco dias é então inoculado um balão de Erlenmeyer com inóculo produzido no tubo de ensaio perfazendo 300 mL com meio MES-Volvox-medium; diariamente os balões são mantidos em agitação constante. Procede-se então à preparação do meio autoclavado de Macronutrientes 20-5-5 (TF1) (0,2 ml/L) e Micronutrientes (0,2 ml/L).

Os fotobioreactores utilizados neste exemplo são cilindros verticais de metacrilato, com diâmetros exteriores de 100 mm e 250 mm, espessura entre os 2 e 4 mm e altura de 2040 mm, com flanges, de fácil abertura, no topo e fundo para manter estanquicidade, mas com orifícios para acesso a recolha de amostras, transferência do meio e injeção de ar enriquecido com CO₂.

Decorridos cinco dias da inoculação dos balões de Erlenmeyer é inoculado o fotobioreactor cilíndrico vertical 100 mm de diâmetro e adicionado o meio autoclavado de modo a perfazer 25% do seu volume e uma taxa de diluição entre 2 e 2,5 vezes o volume inicial; é adicionado CO₂ comercial à taxa de 1% (v/v) e ar à velocidade de 7 m/s. Decorridos três e seis dias, adiciona-se o dobro de água esterilizada de modo a perfazer 50% e 100% do volume respectivamente, e adicionam-se fertilizantes comerciais líquidos TF1 (0,2 ml/L) e Micro (0,2 ml/L) em cada diluição. Passados outros seis dias é então inoculado o fotobioreactor com 25 cm de diâmetro, e é adicionada água de modo a perfazer 25% do seu volume. Adiciona-se igualmente 0,2 ml/L de TF1 e 0,2 ml/L de Micro por cada litro de água adicional. Finalmente decorridos três e seis dias, adiciona-se o dobro de água esterilizada de modo a perfazer 50% e 100% do volume respectivamente e também fertilizantes comerciais líquidos TF1 0,2 ml/L e Micro 0,2 ml/L em cada diluição.

2ª Fase - Produção Outdoors

Descrição dos fotobioreactores

Os fotobioreactores utilizados neste exemplo são cilindros verticais de metacrilato (acrílico) com:

- Diâmetros exteriores - 400 mm; 250 mm e 100 mm;
- Altura - 2040 mm;

- Espessura do metacrilato - 6mm; 4 mm; 2 mm;
 - Flange no fundo com acesso para retirar amostras e permitir a transferência do meio, injeção de ar e controlo de temperatura;
 - Flange no topo com acesso para adição de inóculo, fertilizantes, limpeza e desinfecção. Estas flanges são providas de borbulhadores para desgasificação e purga de ar. Esses borbulhadores possuem desinfectante para evitar a entrada de agentes contaminantes, tais como microalgas indesejáveis, bactérias, fungos, etc. Podem também estar equipados com um colector que permite recuperar o CO₂ não absorvido;
 - Na base está acoplado um difusor de ar enriquecido com CO₂, em estrela com 8 raios, com orifícios entre 0,5 e 1 mm de diâmetro;
- Os fotobioreactores estão suspensos para facilitar o acesso inferior e os processos de descarga.

Sistema de Produção pela técnica de regressão

Para melhor compreensão desta descrição remete-se ao quadro sinóptico e diagrama de fluxos em anexo (Figuras 1 e 2).

O sistema é constituído pelos seguintes componentes:

1. Fotobioreactores;
2. Tubagem e válvulas diversas;
3. Produção de ar comprimido e mistura de gases (ar + CO₂);
4. Tanque de autofloculação;
5. Colheita por Separação de Fases (Centrifugação);
6. Desidratação (estufa ou *Spray Dryer*);
7. Acondicionamento (embalagem em vácuo e estanque à luz).

Procedimento

Os fotobioreactores de 400 mm são inoculados com inóculo à densidade de 0,2 g/L (peso seco) de modo a perfazer 25% do seu volume onde são adicionados fertilizantes comerciais líquidos TF1 0,2ml/L e Micro 0,2 ml/L. O ar é produzido e ligeiramente comprimido num ventilador de alta pressão e posteriormente misturado ao CO₂ em estado puro à razão de 1% a 2%. A velocidade do ar é de 7 m/s e a mistura de gases é forçada através de um filtro HEPA no sentido de capturar

eventuais agentes contaminantes e a mistura de gases é injectada através do difusor no fotobioreactor. A água utilizada é sempre esterilizada através da utilização de radiação ultravioleta e a temperatura do meio é mantida entre 23 e 27 °C durante o período diurno, através do controlo da temperatura do ar injectado nos fotobioreactores. O ar é aquecido ou arrefecido conforme a variação da temperatura do meio.

Ao 4º dia procede-se à primeira diluição para o dobro do volume com a adição simultânea de fertilizantes comerciais líquidos TF1 0,2 ml e Micro 0,2 ml por cada litro de meio adicional e ao 6º dia procede-se à segunda diluição de modo a perfazer o volume máximo com a adição de fertilizantes comerciais líquidos TF1 0,2 ml e Micro 0,2 ml por cada litro adicional. Ao 13º dia quando se atinge a concentração em peso seco entre 0,35 g/L e 0,48 g/L transfere-se o meio para os reactores de 250 mm de modo a aumentar a penetração da luz solar e incrementar por esta via a taxa de reprodução celular. Ao 20º dia quando se atinge a concentração em peso seco entre 0,8 g/L e 1,1 g/L transfere-se novamente o meio para os reactores de 100 mm de modo a aumentar a penetração da luz solar e incrementar por esta via a taxa de reprodução celular. Ao 22º dia adiciona-se Acetato de Sódio à razão de 2,5 g/L de meio no sentido de induzir o enquistamento das células de *Haematococcus pluvialis*, com a consequente produção de Astaxantina.

Entre o 29º e o 32º dia, atingida uma densidade entre 2 e 2,6 g/L (peso seco) e uma concentração de carotenóides entre 3 e 4,8%, é realizada a colheita para o tanque de autofloculação sendo então o meio centrifugado a cerca de 9000 rot/min; procedendo-se à separação de fases. A fase líquida é armazenada para esterilização e posterior utilização em novo ciclo e a fase sólida é filtrada para aumentar a concentração. O filtrado é então sujeito desidratação até se obter um teor de humidade entre 1 e 7%, sendo esta biomassa desidratada embalada a vácuo numa estrutura laminada composta por uma primeira camada de poliéster, segunda de alumínio, terceira de poliéster, para conservação das suas propriedades até posterior extracção da

astaxantina pelo processo de "Extracção com Dióxido de Carbono Supercrítico".

Se bem que descrita a invenção com referência à sua concretização preferida, esta não deve ser considerada como limitante do âmbito da invenção tal como aqui definido. Várias alterações poderão ser efectuadas a partir da descrição aqui proporcionada sem afastamento do âmbito do novo processo da invenção aqui reivindicado.

Lisboa, 2013-09-19

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção à escala industrial de microalgas produtoras de astaxantina do género *Haematococcus* e mais particularmente *Haematococcus pluvialis*, com optimização da produção de astaxantina, caracterizado por compreender a produção de um inóculo da microalga e o seu cultivo em larga escala num meio composto por água, nutrientes e ar enriquecido com CO₂ e em exposição à radiação solar, através de um método denominado regressivo que consiste no cultivo sucessivo numa primeira sequência de fotobioreactores fechados do tipo coluna de bolhas de dimensões sucessivamente crescentes, operando cada fotobioreactor em modo descontínuo e até à obtenção de um máximo de produção de biomassa antes da passagem para o fotobioreactor seguinte na sequência, e posterior regressão para uma segunda sequência de fotobioreactores fechados do tipo coluna de bolhas de dimensões sucessivamente decrescentes, operando cada fotobioreactor em modo descontínuo e até à obtenção de um novo máximo de produção de biomassa e de um máximo de produção de astaxantina antes da passagem para o fotobioreactor seguinte na sequência.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os referidos fotobioreactores serem cilindros verticais e a primeira sequência de fotobioreactores ser constituída por três diâmetros sucessivamente crescentes de fotobioreactores de cerca de 100, 250 e 400 mm, respectivamente, e a segunda sequência de fotobioreactores ser constituída por dois diâmetros sucessivamente decrescentes de fotobioreactores de cerca de 250 e 100 mm, respectivamente.

3. Processo de acordo com a reivindicação anterior caracterizado por a primeira trasfega para fotobioreactor de menores dimensões ser efectuada quando se atinge uma concentração em peso seco entre cerca de 0,35 g/L e 0,48 g/L, tipicamente ao 13º dia de cultivo, a segunda trasfega para fotobioreactor de menores dimensões quando se atinge uma concentração em peso seco entre cerca de 0,8 g/L e 1,1 g/L, tipicamente ao 20º dia de cultivo.

4. Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por adicionalmente se induzir o enquistamento das microalgas, em adição ao já existente promovido na fase de regressão do processo, por indução de *stress* salino no fotobioreactor fechado de menores dimensões, mais preferivelmente através da adição de acetato de sódio à razão de 2,5 g/L de meio.

5. Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores caracterizado por adicionalmente se proceder à colheita e tratamento da biomassa obtida quando se atinge uma densidade entre cerca de 2 a 2,6 g/L (peso seco) e uma concentração de carotenóides entre cerca de 3 e 4,8%.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por a colheita ser efectuada para um tanque de autofloculação e se efectuar uma separação de fases por centrifugação do meio, sendo a fase líquida armazenada para posterior utilização em novo ciclo produtivo e a fase sólida desidratada até um teor de humidade entre 1 e 7%, e embalada para conservação das suas propriedades até posterior e eventual extracção da astaxantina.

Lisboa, 2013-09-19

Figura 1

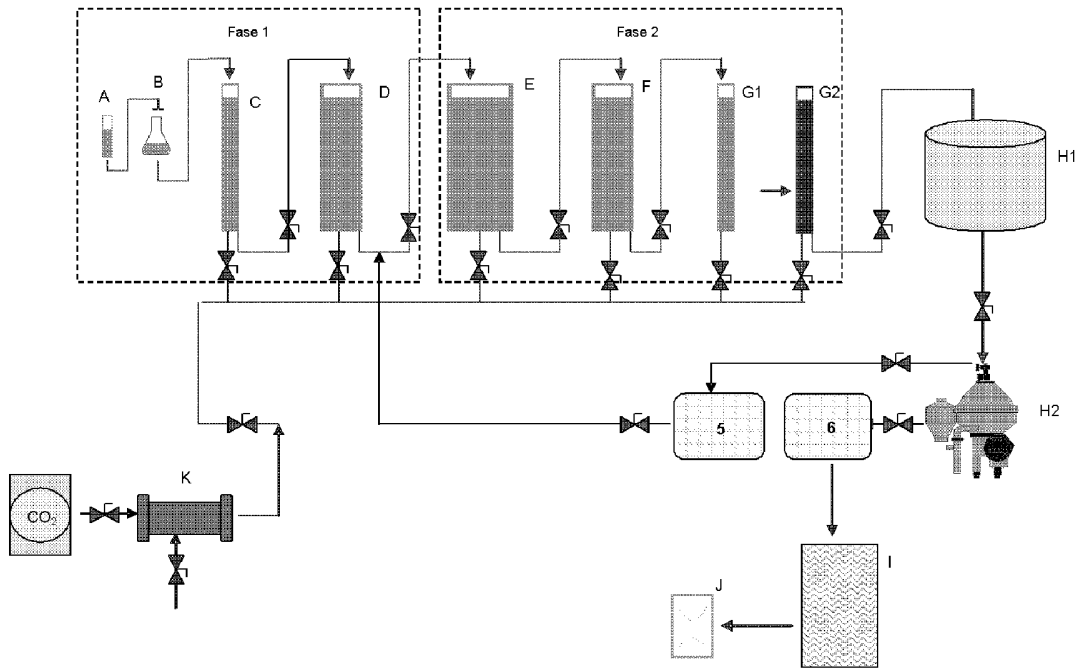


Figura 2

