

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0804115-6 A2**



* B R P I 0 8 0 4 1 1 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 02/05/2008
(43) Data da Publicação: 12/01/2010
(RPI 2036)

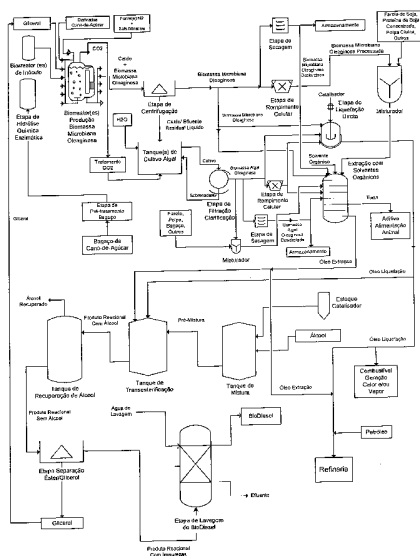
(51) *Int.Cl.*:
C12P 7/64 (2010.01)
C10L 1/00 (2010.01)
C11C 3/04 (2010.01)
C11B 1/04 (2010.01)
C12P 39/00 (2010.01)

(54) Título: **PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL**

(73) Titular(es): Ouro Fino Participações e Empreendimentos S.A

(72) Inventor(es): Dolivar Coraucci Neto

(57) Resumo: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL. A presente invenção trata de um processo para a produção de biodiesel e/ou óleo combustível a partir de biomassa microbiana oleaginosa e/ou algal e/ou de derivados e resíduos da cana de açúcar. Os produtos objeto da presente invenção são adequados para uso direto em motores e na geração de energia ou vapor. O processo integrado segundo a presente invenção compreende a utilização, como matéria prima, biomassa microbiana oleaginosa obtida a partir de derivados e resíduos da cana de açúcar, a qual é integrada com biomassa algal e/ou com glicerol e são processadas através de etapas de produção de biomassa microbiana oleaginosa de leveduras e/ou fungos filamentosos, etapas de produção simultânea de biomassa algal pelo aproveitamento integral dos resíduos, CO₂ e caldo residual da referida produção de biomassa microbiana, bem como etapas de extração e transesterificação dos lipídios contidos biomassa, com reutilização do glicerol residual produzido. O processo descrito trata-se de tecnologia inovadora, ecologicamente sustentável, que não gera qualquer tipo de resíduo, proporcionando ainda a vantagem de liberar importantes volumes de oxigênio na atmosfera.





“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção trata de um processo para a produção de biodiesel e/ou óleo combustível a partir de biomassa microbiana oleaginosa e/ou algal e/ou de derivados e resíduos da cana de açúcar. Os produtos objeto da presente invenção são adequados para uso direto em motores e na geração de energia ou vapor.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

Com as previsões atuais de que as reservas de petróleo estarão extintas nas próximas décadas, outras fontes de energias têm sido pesquisadas em todo mundo. Dentre essas alternativas, os biocombustíveis, tais como etanol e biodiesel, apresentam um potencial significativo, por serem formas de energias pouco poluentes e ao mesmo tempo renováveis.

No caso específico do biodiesel, em produção de grandes escalas, as tecnologias têm sido desenvolvidas a partir de matérias primas ricas em lipídios e ácidos graxos de origem vegetal e animal. Desafortunadamente os lipídios e gorduras derivados de plantas e de animais, produzidos em todo mundo, atendem apenas a demanda de consumo para produção de alimentos e para a indústria óleo-química. Desta forma, é de extrema importância a busca de outras fontes alternativas de produção de lipídios e ácidos graxos para uso na produção de biodiesel e óleo combustível. A síntese de lipídios e gorduras por via microbiana apresenta-se como alternativa tecnológica para essa finalidade.

Três são as principais vantagens de produção de lipídios por microrganismos. A primeira, é a grande rapidez de geração, ou seja, a biomassa microbiana dobra em um intervalo de horas, leveduras produzem uma nova geração entre uma e três horas, algas entre duas e seis horas e

fungos de quatro a doze horas. A segunda, é a necessidade de menor área de produção para uma mesma massa de material graxo, ou seja, é possível produzir em um fermentador a mesma quantidade de lipídios em muito menos tempo e em área até trinta vezes inferior àquela utilizada em plantios de vegetais. E a terceira, é a possibilidade de se ter um melhor controle do processo de produção e do produto, ou seja, o controle dos biorreatores, ou fermentadores, é muito mais simples do que o controle de uma lavoura agrícola, além de não dependerem de variações climáticas e/ou sazonáveis.

Nem todos os microrganismos acumulam lipídios em quantidade suficiente para viabilizar a sua produção em escala econômica e industrial. Os microrganismos considerados oleaginosos aqueles que podem acumular mais de 20% de lipídios em sua biomassa seca. Os fundamentos básicos da fisiologia para acumulação de lipídios por microrganismos têm sido estudados por vários pesquisadores ao redor do mundo.

As leveduras podem ser citadas como um dos grupos de microrganismos mais interessantes, por sua capacidade de acumular grandes quantidades de lipídios ao nível intracelular, bem como pelas suas taxas de crescimento relativamente altas e sua semelhança na composição dos triglicerídios com a dos óleos vegetais.

Em alguns casos, esses microorganismos podem acumular até 70% de seu peso seco em lipídios, sendo que os principais triglicerídios formados são de cadeias entre 16 e 18 átomos de carbono.

Durante a Segunda Guerra Mundial, com a escassez de lipídios de origem vegetal, o cultivo de leveduras possibilitou a fabricação de óleos e seus derivados, como margarinas e outros produtos. Na indústria cosmética atual, ácidos graxos de alto valor comercial são usados como emulsificantes e estabilizantes. Esses lipídios podem igualmente ser sintetizados por via microbiana.

As algas representam outra fonte importante de lipídios, são igualmente capazes de acumular concentrações de até 65% em relação ao peso de sua biomassa seca. Elas podem ser classificadas como organismos fotossintéticos, como as plantas, pois utilizam energia solar para, juntamente com água e dióxido de carbono, gerar biomassa. Dentro dessa classificação, a presente invenção tem também como objetivo a utilização de organismos fotossintéticos que crescem em ambiente aquático, ou seja, macroalgas, microalgas e outros organismos aquáticos para produção de produtos de interesse comercial, em particular lipídios para produção de biodiesel e óleo combustível.

Macroalgas são plantas de crescimento acelerado e alcançam tamanhos consideráveis, em torno de 50m de comprimento. Já as microalgas, como o próprio nome sugere, são organismos fotossintéticos microscópicos encontrados em ambientes marinhos e de água doce.

O estudo das microalgas ainda é relativamente pouco conhecido e as algas como um todo são organismos ainda muito pouco compreendidos e empregados em termos biotecnológicos. As microalgas são divididas em uma variedade de classes, de acordo com seus pigmentos, ciclo de vida e estrutura celular básica. As quatro classes mais importantes de microalgas em termos de abundância são *Bacillariophyceae*, *Chlorophyceae*, *Cyanophyceae* e *Chrysophyceae*. Elas são as formas mais primitivas de plantas, possuem mecanismo fotossintético similar àquele das plantas superiores, entretanto, convertem a energia solar em outras formas mais eficientes, devido a sua estrutura celular simples. Além disso, como as células crescem em suspensão aquosa, elas possuem mais acesso à água, dióxido de carbono e outros nutrientes. Por esses motivos, as microalgas são capazes de produzir trinta vezes ou mais a quantidade de óleo por unidade de área plantada, quando comparada aos grãos de oleaginosas.

Pode-se afirmar, portanto, que as microalgas formam um grupo heterogêneo, o qual engloba microrganismos fotossintetizantes tanto eucarióticos quanto procarióticos. As microalgas são geralmente unicelulares, Gram-negativas e vivem predominantemente em ambiente aquático.

5 A grande eficiência fotossintética desses microrganismos faz com que eles formem a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos, sendo responsáveis por cerca de 40-50% da fixação de carbono e da produção de oxigênio do planeta. Além disso, as microalgas sintetizam matéria orgânica a partir de substratos inorgânicos como sais, dióxido de carbono e água.

10 A partir desse conhecimento, a produção de lipídios por via microbiana surge como uma alternativa viável e inovadora na concorrência com a produção de óleos e gorduras de origem vegetal e/ou animal. Os microrganismos, como seres vivos mais simples que plantas e animais, poderão ser utilizados de maneira econômica em larga ou pequena escala na
15 produção de biodiesel ou na geração de combustíveis energéticos, bem como na produção de outros produtos.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

É, portanto, objetivo da presente invenção, prover um processo industrial que possa integrar as diversas fontes de matéria prima para a
20 produção de biodiesel e/ou óleo combustível, como uma alternativa considerável aos combustíveis fósseis atuais.

Os produtos, lipídios de origem microbiana e/ou algal, objeto da presente invenção não são poluentes e são obtidos de fontes renováveis, compreendendo derivados e resíduos da cana de açúcar tais como caldo,
25 melaço, açúcar refinado e/ou integral, açúcares provenientes da hidrólise das folhas e/ou bagaço, os efluentes líquidos residuais provenientes da produção de biomassa microbiana e o dióxido de carbono, além do glicerol, subproduto proveniente da produção de biodiesel. Todos esses substratos podem ser

utilizados de forma isoladas ou de qualquer forma integrados em um mesmo processo ecologicamente adequado e inovador.

As figuras ilustrativas, em anexo, detalham as características do processo de produção de biodiesel e/ou óleo combustível segundo a presente

5 invenção, sendo que:

- A Figura 1 ilustra um fluxograma geral do processo integrado segundo a presente invenção;

- A Figura 2 ilustra um fluxograma das etapas de pré-tratamento e hidrólise de bagaço de cana de açúcar;

10 - A Figura 3 ilustra um fluxograma da unidade de produção de biomassa microbiana oleaginosa;

- A Figura 4 ilustra o perfil da evolução cinética dos principais parâmetros da produção de biomassa microbiana oleaginosa;

15 - A Figura 5 ilustra um fluxograma das unidades de cultivo e recuperação de biomassa algal;

- A Figura 6 ilustra um fluxograma da etapa de extração de lipídios e liquefação direta de biomassa microbiana oleaginosa e biomassa algal;

- A Figura 7 ilustra um fluxograma da etapa de transesterificação de lipídios; e

- A Figura 8 ilustra um fluxograma de utilização alternativa de lipídios.

20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como ilustrado na Figura 1, em acordo com a presente invenção, o processo para a produção de biodiesel e/ou óleo combustível a partir da biomassa microbiana oleaginosa e/ou algal obtida dos derivados e resíduos da cana de açúcar, em sua forma integrada, compreende sete unidades de
25 processamento, as quais englobam as etapas de produção e extração de lipídios microbianos e algal, a etapa da produção de biomassa microbiana oleaginosa de leveduras e/ou fungos filamentosos obtidos a partir dos derivados e resíduos de cana de açúcar, bem como a etapa da produção de

biodiesel e reutilização do glicerol proveniente da unidade de transesterificação dos lipídios. A biomassa algal é produzida concomitantemente através do aproveitamento integral dos resíduos, CO₂ e caldo residual, efluente líquido da produção de biomassa microbiana. Essas unidades básicas compreendem:

5 Um conjunto de Processamento do Bagaço de Cana de Açúcar (Unidade 1);

Um conjunto de Produção de Biomassa Microbiana a Partir de Derivados da Cana de Açúcar, Bagaço de Cana de Açúcar Hidrolisado e Glicerol (Unidade 2);

10 Um conjunto de Processamento da Biomassa Microbiana Oleaginosa (Unidade 3);

Um conjunto de Cultivo e Recuperação de Biomassa Algal (Unidade 4);

Um conjunto de Extração e Liquefação Direta Térmica de Lipídios Microbiano e/ou Algal (Unidade 5);

15 Um conjunto de Transesterificação de Lipídios (Unidade 6); e

Um conjunto de Processamento para Utilização do Óleo Combustível Obtido por Liquefação Direta Termopressurizada para Geração de Calor e/ou Vapor e Aplicação como Adjuvante ao Petróleo (Unidade 7).

20 O processo segundo a presente invenção será a seguir descrito através da seqüência operacional de processamento das diversas fontes de matérias primas para a produção de biodiesel e/ou óleo combustível. O processamento descrito foi realizado em instalações de estudos e análises em condições laboratoriais. Assim sendo, as diversas etapas do processo da invenção compreendem:

25 **1ª ETAPA - HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR**

Na Unidade 1 - Processamento do Bagaço de Cana de Açúcar, conforme ilustrado no fluxograma da Figura 2, o bagaço de cana de açúcar resultante da extração do caldo, que é um resíduo lignocelulósico produzido em

grandes volumes, em média 150 kg/ton de cana moída, é reutilizado após hidrólise como fonte de carbono no processo de produção de biomassa microbiana oleaginosa de leveduras e/ou fungos filamentosos. Com essa finalidade, o bagaço de cana de açúcar passa por duas etapas básicas
5 fundamentais, o pré-tratamento e a hidrólise.

PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

O pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar é requerido para alterar o tamanho e a estrutura das fibras lignocelulósicas, micro e macroscopicamente, bem como para alterar a composição química e estrutura
10 sub-microscópica das mesmas, para que a hidrólise da fração de carboidratos em açúcares monoméricos possa ser alcançada mais rapidamente e com rendimentos mais elevados. Os objetivos do pré-tratamento são a remoção da lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade dos materiais. Um bom pré-tratamento melhora a formação de
15 açúcares ou a habilidade de formação destes através da hidrólise enzimática, assim como evita a degradação ou perda de carboidratos e a formação de subprodutos que possam inibir as reações subseqüentes de hidrólise e formação da biomassa microbiana oleaginosa. O pré-tratamento empregado no processo da presente invenção pode ser realizado por meios físicos, tais como
20 a trituração mecânica ou moagem, ou por meios físico-químicos, químicos, biológicos ou suas combinações.

Segundo a presente invenção, os meios físicos de pré-tratamento são preferidos, mais preferencialmente a trituração mecânica que é uma combinação de corte, trituração e moagem do bagaço. O bagaço de cana de
25 açúcar seco é moído em um triturador de facas, tal como o de marca Sadrind K8/25. Na seqüência, esse material é peneirado, sendo a fração contendo partículas entre 0,1-0,8 mm encaminhada para a etapa de hidrólise ácida. Na trituração mecânica podem ser utilizados igualmente outros tipos de

equipamentos, tais como moinhos de cesto vibratório, moinhos de bola, triturador de martelos, triturador de rolos, amassadores ou qualquer outro equipamento visando sempre a redução das partículas do bagaço, folhas e aparas de cana de açúcar para facilitar a hidrólise desse material celulósico.

5 Dentre os pré-tratamentos físico-químicos que podem ser utilizados igualmente no processo da presente invenção, se faz referência à explosão a vapor, a explosão com fibra de amônia e a explosão com CO₂. Na explosão a vapor, o bagaço de cana de açúcar deve ser inicialmente moído, tratado com vapor saturado de alta pressão e submetido à redução brusca de
10 pressão. Esse procedimento geralmente ocorre entre 100-300°C e 0,43-5,57 MPa, durante um período de tempo que pode variar de alguns segundos até vários minutos.

De forma semelhante, no pré-tratamento com amônia faz-se a exposição do bagaço de cana de açúcar à amônia líquida em alta temperatura
15 e sob elevada pressão, seguida de queda abrupta da temperatura. Esse procedimento utiliza em torno de 1-2 kg de amônia líquida / kg de bagaço de cana de açúcar seco, a uma temperatura entre 60-120°C por um período de reação entre 10 e 60 minutos.

Já no caso da explosão a CO₂, utiliza-se em torno de 2-5 kg de
20 CO₂ / kg de bagaço de cana de açúcar, a pressões em torno de 5,62 MPa, por um período de tempo similar às outras duas técnicas.

Ainda, segundo a presente invenção, um pré-tratamento químico do bagaço de cana de açúcar pode ser feito por ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina e deslignificação alcalina, dentre outros.

25 A ozonólise consiste em degradar a lignina e a hemicelulose utilizando-se para tanto o ozônio. A ozonólise é preferida por ser mais vantajosa, pois não produz resíduos tóxicos, as reações ocorrem à temperatura ambiente e remove lignina de forma muito eficiente. Já o pré-tratamento

químico por via ácida pode utilizar, dentre outros, o ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido fosfórico, diluídos ou concentrados, em condições críticas de pressão e temperatura ou não e de modo contínuo ou em batelada. Essa técnica, no entanto, requer uma etapa de neutralização para que o material
5 possa ser utilizado na produção da biomassa microbiana oleaginosa. Por seu turno, o pré-tratamento químico por via alcalina possui as mesmas variáveis daquele por hidrólise ácida, porém utiliza hidróxido de sódio, amônia ou outros compostos alcalinos em concentrações variando de cerca de 2 a 30%. Além desses três métodos químicos aqui citados, há ainda a possibilidade de se
10 realizar a deslignificação oxidativa do bagaço de cana de açúcar através da exposição deste ao peróxido de hidrogênio em concentrações de 1 a 5% e em temperaturas entre 20-50°C durante um período de tempo de 5 a 30 minutos.

Adicionalmente, existe ainda a possibilidade de se realizar o pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar através de procedimentos biológicos.
15 Para tanto, são utilizados microrganismos, tais como fungos basidiomicetos (brown-, white- and soft-rot fungi), capazes de degradar lignina e hemicelulose.

Todos os pré-tratamentos do bagaço de cana de açúcar acima citados estão incorporados no âmbito da presente invenção.

Seguindo-se o pré-tratamento, é efetuada a hidrólise do bagaço
20 de cana de açúcar, através dos quais os polímeros de carboidratos são convertidos em açúcares monoméricos. A celulose pode ser rompida hidroliticamente a glicose tanto via enzimática, através da ação de celulasas, quanto quimicamente, através da ação de ácidos. Após a hidrólise, os açúcares de seis carbonos, também chamados hexoses (glicose, galactose e manose),
25 são prontamente fermentados, enquanto que as pentoses (xilose e arabinose) são fermentadas apenas por algumas poucas cepas ou linhagens de microrganismos. A hidrólise química pode ser realizada através do uso de ácido, diluído ou concentrado, tais como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido

fosfórico e/ou outros ácidos, com concentrações variando de 2-80%, a temperaturas variando de 25-150°C, durante um período de reação variando de alguns minutos a diversas horas, com ou sem sistemas de recuperação ou neutralização de ácidos.

5 Também, de acordo com a presente invenção, a hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar é realizada utilizando-se enzimas altamente específicas, denominadas celulasas. Esse método emprega condições muito mais brandas quando comparado à hidrólise ácida, ocorrendo em faixas de pH em torno de 4,5 e em temperaturas variando de 25-60°C. As
10 celulasas são geralmente uma mistura de diversas enzimas, sendo que no processo de acordo com a presente invenção prefere-se o uso de endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e/ou β -glucosidases (EC 3.2.1.21). Segundo a presente invenção, a hidrólise pode ser realizada com substratos concentrados ou não, com concentrações de
15 celulasas variando de 5 a 40 FPU/g de substrato, tempo de reação variando de 24-96 horas e utilizando enzimas imobilizadas ou não.

Por se considerada mais vantajosa e econômica, a hidrólise ácida é preferida, conforme os resultados práticos obtidos em condições otimizadas.

HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

20 Conforme ilustrado na Figura 2, o bagaço da cana de açúcar seco e moído, com partículas entre 0,1-0,8mm é hidrolisado em um reator de aço Inox AISI 316 com capacidade de 10 litros a 125 °C, por 20 minutos, utilizando 1 kg de matéria seca para 120 gramas de H₂SO₄ concentrado, com uma relação sólido líquido de 1:10.

25 Após hidrólise, a suspensão é centrifugada para remoção do resíduo sólido não hidrolisado, o qual é lavado com água para extração dos açúcares remanescentes. O hidrolisado (sobrenadante) obtido é concentrado em cerca de seis vezes em evaporador rotatório a vácuo tal como o secador

BÜCHI R-215, a uma temperatura de cerca de 65 °C, como forma de aumentar a concentração dos açúcares totais presentes no hidrolisado. O hidrolisado concentrado é então tratado para eliminar compostos tóxicos derivados do furano, tais como furfural e hidroximetilfurfural, derivados da degradação da lignina, que são compostos fenólicos, e ácidos fracos tais como ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico, que são formados durante o processo de hidrólise ácida e atuam como substâncias inibidoras do crescimento microbiano, neste caso a levedura. O hidrolisado de bagaço de cana de açúcar é finalmente detoxificado segundo técnica descrita por Marton et al. (2003), a qual consiste em alterar o pH através da adição de óxido de cálcio comercial (CaO) até pH 7.0, seguida de uma acidificação com ácido fosfórico até pH 2,5 e posterior neutralização com óxido de cálcio (CaO). Em cada uma dessas etapas de alteração do pH são feitas remoções do precipitado por filtração. Na seqüência, o hidrolisado é misturado com carvão ativado granular numa proporção de 10 gramas de carvão para cada 1 litro de hidrolisado em um reator de aço Inox AISI 316, capacidade de 10 litros, contendo no seu interior um sistema de agitação mecânica por pás. Os melhores resultados em termos da detoxificação do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar foi alcançado após um tratamento por um tempo de cerca de 40 minutos, em temperaturas de cerca de 65 °C e com agitação de cerca de 245 rpm.

Os açúcares (glicose, xilose e arabinose) e o ácido acético presentes no hidrolisado concentrado foram identificados e quantificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu modelo LC-10 AD, detetor de índice de refração em coluna AMINEX HPX-87H da Bio-Rad utilizando H₂SO₄ 5 mM como fase móvel, 60 °C como temperatura do forno detetor de índice de refração. As amostras foram centrifugadas a 4.500 rpm durante 15 minutos, diluídas com água ultra pura e filtradas em membrana de éster de celulose com porosidade de 0,22 µm. A concentração de fenóis totais

foi feita pelo método de Singleton et al (1999) utilizando reagente de Folin Ciocalteu. Na Tabela 1 é apresentada a composição química do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar após tratamento para sua detoxificação utilizando carvão vegetal ativado e alteração do pH. A xilose se constitui no principal carboidrato, responde por aproximadamente 87% dos açúcares presentes no hidrolisado de bagaço de cana de açúcar concentrado e detoxificado. O pré-tratamento para detoxificação do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar reduziu em cerca de 17,41% a concentração de xilose em relação a seu valor inicial. No caso dos compostos tóxicos fenólicos essa redução foi de cerca de 88,85%, já no caso do ácido acético esta foi de cerca de 63,73%.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Componentes	<u>CONCENTRADO 6X</u>	
	Hidrolisado (g/l)	
	Concentrado 6X	
	1	2
Glicose	6,12	5,53
Xilose	108	89,28
Arabinose	8,90	8,10
Ácido acético	5,10	1,85
Fenóis	8,52	0,95
pH	7,0	7,0

1= antes da detoxificação ; 2= depois da detoxificação

15 **2ª ETAPA – PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA DE LEVEDURA OLEAGINOSA**

Na Unidade 2 - Produção de Biomassa Microbiana, conforme ilustrada na Figura 3, as matérias primas básicas utilizadas são os derivados da cana de açúcar, tais como o caldo, melaço, açúcar mascavo e/ou refinado, bagaço de cana de açúcar hidrolisado concentrado e detoxificado (BHCD),

glicerol e/ou suas misturas. Nessa etapa, de acordo com a presente invenção, realiza-se:

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA CEPA DE LEVEDURA

A levedura oleaginosa, *Rhodosporidium toruloides* OF A25 foi isolada do solo em uma plantação de cana de açúcar no Estado do Paraná - Brasil e identificada através de suas características morfológicas e propriedades fisiológicas, metabolismo bioquímico, assim como por técnicas de biologia moleculares. A cepa *R. toruloides* OF A25 foi selecionada por sua habilidade em acumular triacylglicerol (TAG) em sua biomassa quando cultivada em meios ricos em fontes de carbono, tais como sacarose e xilose, derivadas de melaço, hidrolisado de bagaço de cana de açúcar e glicerol, porém pobre em fontes de nitrogênio. A cepa *R. toruloides* OF A25 foi conservada por liofilização em freezer, em temperatura de cerca de 80 °C e sub-cultivada em caldo e agar YM (Yeast Medium).

CRESCIMENTO DE R. TORULOIDES OF A25 EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Esse experimento teve por base a utilização dos diferentes resíduos provenientes da industrialização da cana de açúcar. O melaço de cana de açúcar (MCA) é um licor viscoso escuro, rico em açúcares não cristalizáveis gerado durante a fabricação do açúcar. Sua composição é bastante variável, pois depende de fatores agrícolas e industriais tais como a variedade da cana de açúcar, o grau de maturação e as condições climáticas, dentre outras. Os principais componentes do melaço são água, carboidratos e compostos de origem orgânica como os aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos e olefínicos, vitaminas, proteínas e fenóis, dentre outros. O melaço contém também uma fração de origem mineral de grande importância nos quais estão presentes metais e não metais em proporções significativas. Na Tabela 2 abaixo é apresentada a composição média do melaço de cana de açúcar utilizado no processo da presente invenção conforme aqui descrito, o

qual foi adquirido na empresa Jardest S.A. Açúcar e Alcool, Via Anhanguera km 340 – Jardinópolis – SP, Brasil. A sacarose é o açúcar predominante, responde por cerca de 80% dos açúcares presentes. A presente invenção prevê igualmente o uso do caldo de cana de açúcar, no qual embora a
 5 sacarose apareça como açúcar predominante, sua concentração é inferior àquela encontrada no melaço.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Componente	%
Sacarose	46,9
Glicose	5,2
Frutose	6,7
Cinzas	11,5
Outras substâncias não carboidratos	16,4
Água	14,5
pH	5,5

Como já relatado anteriormente, a presente invenção prevê a utilização do glicerol isolado e/ou em associação com melaço e/ou caldo de
 10 cana de cana de açúcar e/ou hidrolisado de bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono para produção da biomassa oleaginosa de *Rhodospiridium toruloides* OF A25. O glicerol se constitui num subproduto, resíduo do processo de transesterificação dos lipídios, neste caso triacilgliceróis (TAG), durante a fabricação do biodiesel a partir de biomassa de levedura oleaginosa e/ou algal.
 15 A reciclagem integrada de todos esses resíduos é fator preponderante para os propósitos da presente invenção.

PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo, a cepa *Rhodospiridium toruloides* OF A25 foi descongelada, repicada em meio YM (Yeast Medium) sólido, e

submetida ao crescimento em estufa a cerca de 30°C durante 5 dias. Foi transferida em câmara de fluxo laminar para frascos Erlenmeyer de 500ml contendo 100ml do meio líquido YM estéril. Esses frascos foram transferidos para uma incubadora de movimento rotatório New Brunswick Scientific Co., a
5 cerca de 30 °C, 150 rpm por um período de cerca de 72 horas. O meio líquido YM é composto por glicose (10g/l), peptona (5,0 g/l), extrato de levedura (3,0 g/l), extrato de malte (3,0 g/l), Agar (20 g/l) e com pH 5,0. A única diferença desse meio com o YM sólido é a presença do Agar em uma concentração de 20 g/l.

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA LEVEDURA OLEAGINOSA RHODOSPORIDIUM

TORULÓIDES OF A25

Frascos Erlenmeyer de 2l contendo 400 ml de diferentes meios de cultivo estéril, conforme ilustrado na Tabela 3 (condições 1-15) abaixo foram inoculados com 10% v/v de uma cultura ativa e recém obtida de
15 *Rhodospiridium toruloides* OF A25, segundo descrito no item anterior, com pH ajustado para cerca de 5,0 com HCl 1,0N. Os frascos foram então transferidos para uma incubadora de movimento rotatório New Brunswick Scientific Co. a uma temperatura de cerca de 30 °C, 150 rpm, por cerca de 72 horas. Como fonte de carbono, foi utilizado o melaço de cana de açúcar (substrato rico em
20 sacarose), hidrolisado de bagaço de cana de açúcar detoxificado e concentrado 6X (substrato rico em xilose), glicerol (sub-produto da produção de biodiesel) e suas associações. Segundo um aspecto da presente invenção, o melaço de cana de açúcar pode ser perfeitamente substituído pelo caldo de cana de açúcar em função da disponibilidade, sazonalidade e por economia de
25 processo. A concentração em termos de açúcares totais, presentes no melaço de cana de açúcar e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar é determinada pelo método do fenol sulfúrico ou em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Varian Pro Star, modelo 500, com módulo de distribuição de

solvente modelo 240, forno modelo 500, detector de índice de refração modelo 350, software Workstation 5.0, coluna de separação SZ 5532 Shodex, que separa os componentes da amostra por tamanho molecular. As condições de análise foram em fase móvel H₂O:acetonitrila (20:80), 1 ml/min, 65 °C, volume de injeção 15 µl (capacidade do loop 5µl). A padronização das leituras de concentração é feita com soluções aquosas de 1 a 20 g/l de padrão grau analítico. As amostras são previamente centrifugadas (10.000g, 5 min) e filtradas em membranas PVDF hidrofílicas de 0,22 µm (Millipore). No caso do glicerol, suas concentrações nos experimentos foram quantificadas por CLAE.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Duas fontes de nitrogênio foram selecionadas e utilizadas, especificamente extrato de levedura e uréia, ou suas combinações e misturas. Ressalta-se que outras fontes de nitrogênio, de origem orgânica ou inorgânica, bem como concentrações variadas poderão ser utilizadas, tendo por objetivo maximizar a produção e/ou acúmulo de lipídios na biomassa microbiana segundo a presente invenção.

Após cultivo por cerca de 72 horas, os frascos foram retirados do incubador e a biomassa oleaginosa foi separada por filtração em papel de filtro quantitativo, sob vácuo. Após uma primeira filtração, a biomassa foi lavada duas vezes com água destilada e seca em estufa a vácuo por cerca de 24 horas à cerca de 60 °C e pesada em balança analítica. A concentração total de lipídios presente na biomassa da levedura foi determinada por extração Soxhlet.

TABELA 3 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS POR *RHODOSPORIDIUM*

TORULÓIDES OF A25 EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO.

A	B	C	D	E	F	G	H
1		-	100	10	-	16,05	15,14±0,97
2	-	100	-	10	-	18,73	24,30±1,74
3	100	-	-	10	-	32,13	41,18 ± 1,42

A	B	C	D	E	F	G	H
4	100	-	-	-	2,5	27,60	31,03±2,73
5	-	100	-	-	2,5	14,21	14,62±0,94
6	-	-	100	-	2,5	12,65	9,25±1,05
7	50	50	-	10	-	26,53	34,01±1,12
8	50	-	50	10	-	22,08	29,05±1,50
9	-	50	50	10	-	10,12	16,44±1,35
10	50	50	-	5	1,25	24,44	30,10±0,54
11	-	50	50	5	1,25	23,07	25,33±2,04
12	40	30	30	-	2,5	15,49	17,02±0,71
13	40	30	30	5	2,25	26,47	33,61±2,13
14	30	40	30	-	2,5	8,15	13,12±0,34
15	30	30	40	-	2,5	9,17	14,00±1,11
16	30	30	40	5	2,5	19,25	24,79±2,02

A= Condição de Cultura; B= Melaço de cana (g/l); C= Hidrolisado de bagaço de cana detoxificado concentrado 6X (g/l); D= Glicerol (g/l); E= Extrato de levedura (g/l); F= Uréia (g/l); G= Biomassa (g/l); H= Conteúdo lipídio (%)

Os resultados apresentados na Tabela 3 acima demonstram que a levedura *Rhodosporidium toruloides* OF A25 pode crescer e acumular elevadas concentrações de lipídios em meios contendo resíduos da industrialização da cana de açúcar, tais como melaço, caldo e hidrolisado de bagaço, assim como o glicerol, resíduo gerado durante a fabricação de biodiesel. A Condição de Cultura 3 é a que propiciou as melhores condições ao crescimento celular e acúmulo de lipídios. Como já ressaltado anteriormente, o melaço de cana de açúcar, além de ser rico em sacarose, possui também aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos e olefinicos, vitaminas, proteínas e inúmeros minerais. Mesmo quando se substitui a fonte de nitrogênio de origem orgânica (como o extrato de levedura) por outra de origem fóssil (como a uréia), a produção de biomassa seca foi elevada, cerca de 27,60 g/l, com um teor de lipídios da ordem de 31,03%, conforme Condição de Cultura 4. Essa

levedura demonstrou ser também capaz de crescer e acumular lipídios quando cultivada em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar concentrado e detoxificado (BHCD). Como já citado, esse hidrolisado é rico em xilose. Com a presença de extrato de levedura no meio contendo BHCD, a concentração de biomassa seca foi de cerca de 18,73 g/l, quando se utilizou uréia como fonte de
 5 nitrogênio, essa concentração foi de 14,21 g/l, as concentrações de lipídios na biomassa seca foram respectivamente 24,30% e 14,62%, conforme Condições de Cultura 2 e 5. *Rhodosporidium toruloides* OF A25 demonstrou também ser bastante eficiente na assimilação do glicerol quando utilizado como única fonte
 10 de carbono no meio de cultura. A produção de biomassa seca foi de cerca de 16,05 e 12,65 g/l de biomassa seca formada após 72 horas de cultura em shaker, tendo acumulado respectivamente 15,14% e 9,25% de lipídios quando as fontes nitrogênio foram extrato de levedura e uréia, conforme mostram as Condições de Cultura 1 e 6.

15 **PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA LEVEDURA OLEAGINOSA RHODOSPORIDIUM**

TORULÓIDES OF A25 EM BIORREATOR

Diferentes alíquotas de 20 ml do meio X (inóculo) preparado conforme metodologia acima descrita, foram transferidas para frascos Erlenmeyer estéreis de 2l e misturados em 180 ml do meio Y (adaptação)
 20 estéril. Essas composições estão descritas na Tabela 4 abaixo. Esses frascos foram incubados em agitador rotatório do tipo shaker a 30 °C, por cerca de 48 horas, a 150 rpm. Após esse tempo, a levedura está perfeitamente adaptada e apresenta um crescimento vigoroso no novo meio. Esse crescimento e adaptação da levedura ao meio Y é avaliado através da retirada de amostras a
 25 cada 6 horas e realizada contagem das células viáveis, previamente tingidas com eritrosina 1%, em câmara de Neubauer. O biorreator contendo um vaso de cerca de 14l foi preenchido com 9.0l do meio de cultura Z. O vaso do biorreator foi transferido para uma autoclave e o conjunto vaso + meio Z foi

esterilizado a cerca de 120 °C por 15 min. Após resfriamento a temperatura de 30 °C, esse meio foi inoculado com 1l de uma cultura ativa de cerca de 48 horas do meio Y. A produção de biomassa da levedura oleaginosa em biorreator foi conduzida durante cerca de 72 horas, em um equipamento da

5 marca New Brunswick Scientific, modelo Bioflo 110, volume total de 14l, volume útil de 10l, módulo de controle de pH e dO₂ com sonda de O₂ Mettler Toledo InPro 6800 Series O₂ Sensors e sonda de pH Mettler Toledo 425mm modelo 405 DPAS-SC-K85/425 e duas bombas peristálticas para adição de ácido ou base, módulo de controle de nível e espuma, com duas sondas

10 controle e duas bombas peristálticas para adição de antiespumante e água, agitador mecânico com velocidade entre 100-1200rpm, eixo de agitação com duas hélices de Rushton (6 pás) de 74mm, rotâmetro para controle de aeração range de 0 a 15l/min e escala de 1 em 1. Os parâmetros da fermentação foram temperatura de 30 °C, pH 5,0 controlado pela adição de ácido fosfórico 5% e/ou hidróxido de sódio 3 normal, dO₂ 30%, velocidade entre 100-1200rpm,

15 controle automático conforme a saturação de oxigênio e variação de 1vvm (5-10l/min conforme volume de meio).

TABELA 4 MEIOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA OLEAGINOSA NO

BIORREATOR

X (Pré-inóculo)	Y (Meio de Adaptação)	Z (Meio de Produção)
Glicose, 10 g/l	Melaço de cana de açúcar, 10 g/l	Melaço de cana de açúcar, 40 g/l
Peptona, 5 g/l	Hidrolisado de Bagaço de Cana de açúcar concentrado e detoxificado, 5 g/l	Hidrolisado de Bagaço de Cana de açúcar concentrado e detoxificado, 30g/l
Extrato de levedura, 3 g/l	Glicerol, 5 g/l	Glicerol, 30 g/l

X (Pré-inóculo)	Y (Meio de Adaptação)	Z (Meio de Produção)
Extrato de malte, 3 g/l	Extrato de levedura, 5 g/l	Extrato de levedura, 5,0 g/l
pH 5,0	pH 5,0	Uréia, 2,5 g/l
		Anti-espumante, 0,5 ml/l
		pH 5,0

Na Tabela 5 a seguir, e Figura 4, são apresentados a evolução dos principais parâmetros cinéticos, bem como rendimentos globais dessa fermentação em biorreator. Os resultados obtidos demonstram que cerca de 29,95% das fontes de carbono (Tabela 4, Meio Z) foram utilizados pela levedura na produção de biomassa e cerca de 10,81% para produção de lipídios. A biomassa total produzida em biorreator foi de cerca de 22,21% superiores aquela produzida em frascos Erlenmeyer em meio de cultura similar (Tabela 3, Condição Cultura 13), quanto ao acúmulo de lipídios na biomassa foi cerca de 7,5% maior.

TABELA 5. EVOLUÇÃO DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS NO BIORREATOR

T (h)	pH	Açúcar Total (g/l)	Glicerol g/l	Biomassa Seca (g/l)	Lipídios %	Levedura x/s Global (%)	Levedura p/s Global (%)
0	5,0	82,40	29,04	1,32	2,68		
12	5,0	77,90	28,22	1,94	3,47		
24	5,0	45,33	26,48	3,92	9,25		
36	5,0	35,63	14,63	14,25	15,22		
48	5,0	24,72	8,33	17,93	18,5		
60	5,0	10,45	4,15	17,76	32,22		
72	5,0	1,39	2,02	33,67	36,13		
						29,95	10,81

No processo de acordo com a presente invenção fica evidenciada a possibilidade concreta de se empregar como substratos na produção de biomassa oleaginosa de levedura, os resíduos da industrialização da cana de açúcar, tais como o melaço de cana de açúcar e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar concentrado e detoxificado, assim como o glicerol, resíduo da transesterificação dos triacilgliceróis durante a produção de biodiesel. Esses resíduos podem ser empregados de maneira isolada ou em combinações em diversas proporções, juntamente com diferentes fontes de nitrogênio de origem orgânica ou inorgânica ou suas combinações, objetivando sempre altas concentrações de biomassa contendo elevados teores em de lipídios, conforme demonstrados nos experimentos da presente invenção acima descritos. Valores superiores e/ou inferiores aos apresentados nesses exemplos de experimentos poderão ser obtidos em função das condições físico-químicas, nutricionais, equipamentos, microrganismos, otimizações e melhorias que possam ser aportadas ao processo da presente invenção.

A produção de biomassa microbiana oleaginosa, conforme a presente invenção, poderá ser realizada utilizando-se outros gêneros e espécies de leveduras e fungos filamentosos, modificados geneticamente ou não. De modo preferencial, os grupos de leveduras e fungos filamentosos são compostos por *Candida curvata*, *Candida guilhermondi*, *Candida tropicalis*, *Candida sp.*, *Candida oleophila*, *Candida lipolitica*, *Cryptococcus terricolus*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula ciferrii*, *Lipomyces starkei*, *Rhodotorula gracilis*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor miehei*, *Penicillium gladiololi*, *Penicillium javanicum*, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium spinulosum*, *Penicillium ultimum*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulans*, *Mortierella hygrophila*, *M. zychae*, *M. elengata*,

M. parvispora, *M. schmuckeri*, *M. alpina*, *Lypomyces lipofeer*, *Lipomyces tetrasporus*, *Williopsis satumus*, *Candida diddensiae*, *Yarrowia lipolitica*, *Trichosporon cutaneum*, dentre outros, todos capazes de acumular lipídios em sua biomassa durante a fase de crescimento e pós-crescimento. Esses microorganismos são utilizados de maneira isolada ou em associações de dois ou mais.

As referidas leveduras e fungos filamentosos podem ser cultivadas em diferentes modelos de biorreator, dentre outros, do tipo tanque agitado, coluna de bolhas, airlift, leito empacotado, leito fluidizado ou leito gotejante, operando em batelada, batelada alimentada ou de modo contínuo. Os meios de cultivo ilustrados nas Tabelas 3 e 4 poderão ser suplementados ou não com uma fonte mineral ou orgânica de nitrogênio, tal como amônia, sulfato de amônio, fosfato de amônio, farelo de soja, extrato de carne, hidrolisados protéicos de soja, além de KH_2PO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , FeSO_4 , outros minerais e oligoelementos. Durante a formação da biomassa e o acúmulo de lipídios pelas células microbianas poderá ser utilizado, nos biorreatores, uma relação carbono/nitrogênio variando de cerca de 0,5 a 500, um pH variando de 2,5 a 8,5 e uma temperatura na faixa de 10 a 50 °C. O meio de cultivo a base dos derivados da cana de açúcar, seus hidrolisados de bagaço e glicerol, poderá ser ou não pasteurizado ou esterilizado pelo uso do calor como forma de eliminar a carga microbiana naturalmente presente, porém indesejável nas matérias primas. Caso se adote a prática da pasteurização ou esterilização, a temperatura poderá variar de cerca de 62 a 142 °C, em um tempo de exposição térmica variando entre alguns segundos a algumas horas, em função da técnica utilizada. Os meios poderão ser ainda tratados com antibióticos e antifúngicos para redução da carga microbiana indesejável presente nos substratos. No caso do uso de antibióticos, os mesmos deverão ser de amplo espectro, ou seja, possuir ação

contra bactérias Gram (+) ou Gram(-). Após a pasteurização e/ou esterilização, os meios de cultura a base dos derivados da cana de açúcar serão resfriados a temperaturas que poderão variar de 15 a 50 °C. Os meios de cultura destinados a produção de biomassa microbiana e consequente produção de lipídios serão inoculados com linhagens de leveduras e/ou fungos oleaginosos selecionados e cultivados em biorreatores de menor volume, com meio de mesma e/ou diferente composição ao descrito anteriormente. É importante que esses inóculos possuam concentrações elevadas de células viáveis, superior à cerca de 10^3 UFC/cm³, podendo mesmo atingir valores da ordem de 10^{12} UFC/cm³ ou mais. O volume de inóculo utilizado nos tanques de produção poderão variar de 1 a 99 % do volume de trabalho do biorreator de produção, dependendo sempre do sistema empregado, ou seja, batela, batelada alimentada ou sistema contínuo. O meio de cultura no interior do biorreator terá uma temperatura controlada de 15 a 50 °C através de camisas ou serpentinas de aquecimento/resfriamento, na qual poderá circular água fria ou vapor. O pH no interior do biorreator será mantido na faixa de pH 2,5-8,5 em função da linhagem microbiana empregada e será feito através do bombeamento de uma solução contendo ácido ou álcali concentrado. O meio de cultivo no interior do biorreator poderá ser agitado mecanicamente ou não. No caso do uso de agitação, a mesma será feita por um sistema de pás a uma velocidade que poderá variar de 5 a 500 rpm. O meio de cultivo para produção da biomassa microbiana oleaginosa é aerado com um volume de ar na faixa de 0,1 a 5 v/v/m (volume de ar por volume de meio por minuto). Poderá ser utilizando apenas ar, ou uma mistura ar/oxigênio ou apenas oxigênio. A injeção do ar no interior dos biorreatores será realizado por compressores e todo o ar será filtrado em filtros com capacidade de retenção de partículas de até 0,2 µm. O tempo de cultivo para produção de biomassa e acúmulo de lipídios será variável e na ordem de 24 horas a cerca de 150 horas, em função do gênero e espécie do

microorganismo, assim como do sistema de cultivo e do modelo de biorreator empregado, podendo ser de até semanas ou meses, no caso de cultura que opera em sistema contínuo.

A biomassa microbiana produzida na Unidade 2, pode atingir concentrações variando de 15 a 130g/l, dependendo da técnica de cultura empregada, e a acumulação de lipídios pode chegar a concentrações de até 65% ou mais em relação ao seu peso.

3ª ETAPA - CULTIVO E RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA ALGAL

Na Unidade 4 - Cultivo e Recuperação de Biomassa Algal, integrada ao processo segundo a presente invenção, realiza-se o preparo do caldo, efluente líquido resultante da produção de biomassa oleaginosa da levedura *Rhodosporidium toruloides* OF A25, para uso como substrato no cultivo de microalgas. A Figura 5 ilustra um fluxograma da integração da Unidade 4 ao processo da presente invenção, até aqui descrito.

No estudos de desenvolvimento do processo segundo a presente invenção, foi constatado que o caldo, efluente líquido proveniente da separação da biomassa microbiana oleaginosa, quer seja produzido por levedura ou por fungos filamentosos, é um excelente substrato para o cultivo de microalgas oleaginosas ou não. No exemplo de experimento segundo a presente invenção, o caldo da produção de biomassa oleaginosa de *Rhodosporidium toruloides* OF A25 produzida em biorreator foi utilizado para tal finalidade. Esse caldo, foi analisado quanto a sua composição físico-química e utilizado como substrato no cultivo da microalga *Botryococcus braunii* OF C27 nos exemplos de experimentos apresentados a seguir. O caldo, como demonstrado na Tabela 6 a seguir, além de água, possui concentrações importantes de sais minerais e componentes orgânicos, tais como açúcar residual não consumido pelas leveduras, biomassa e fragmentos das células de leveduras, proteínas solúveis, etc. Portanto, por ser rico em matéria orgânica e minerais, dito caldo

possui igualmente uma carga poluidora significativa, com valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio) superiores a cerca de 13.000 mg/l, o que é considerado muito alto em termos ambientais.

5

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DO CALDO FERMENTADO DE *RHODOSPORIDIUM*

TORULÓIDES OF A25*

Componentes	Concentração (mg/l)
DBO	13.900,08
DQO	23.414,04
Cloretos	0,00
Sulfatos	<700,00
Nitrogênio Total	30,00
Matéria orgânica	2,8 %
Açúcar residual	< 1000
Manganês	<0,20
Potássio	307,64
Sódio	153,45
Zinco	<0,20
Alumínio	<10,00
Cálcio	134,38
Cobalto	<0,50
Cobre	<0,50
Ferro	1,17
Fósforo	36,46
Magnésio	145,50
pH	5,0
Densidade	1035

*Análise realizada no CEPPA – Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - UFPR

Como é de conhecimento geral da arte, as indústrias que produzem fermento biológico (biomassa) para panificação ou para aditivos para alimentação animal a base de leveduras do gênero *Saccharomyces*, além de outros, também descartam esse mesmo tipo de resíduo líquido depois de separada a biomassa. O único e tradicional destino desse resíduo são as estações de tratamento de efluentes industriais, nas quais são empregados sistemas de digestão aeróbica e anaeróbica como forma de redução da carga poluente em termos de DBO e DQO.

Como alternativa ao descarte do caldo efluente proveniente da separação da biomassa microbiana, o processo segundo a presente invenção incorpora o referido caldo como meio de cultivo de algas, como forma de redução de carga poluente, bem como para produzir lipídios além de proporcionar a liberação de oxigênio, pelas ditas algas, para o meio ambiente.

Os elementos nutricionais presentes nesse caldo, em particular sais minerais, o tornam um excelente substrato para o cultivo de vários grupos de algas oleaginosas ou não, cujos rendimentos obtidos em termos de biomassa são compatíveis aos meios clássicos descritos na literatura internacional. Observou-se, também, surpreendentemente, que esses efluentes líquidos provenientes da filtração da biomassa de leveduras poderão ser utilizados no cultivo de algas para produção não apenas de lipídios, mas também de proteínas e outros produtos de interesse comercial.

ADAPTAÇÃO DA MICROALGA AO CALDO

Foram realizados estudos prévios de adaptação da microalga *Botryococcus braunii* OF C27 em misturas crescentes de 5, 10, 20, 30 até 100% de caldo ao meio de cultura ESP, ilustrado na Tabela 7 abaixo. Essa adaptação foi feita em frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio.

Os frascos foram transferidos para uma incubadora do tipo shaker, marca TECNAL, modelo TE-421, contendo fotoperíodo, temperatura e agitação controladas. Os cultivos foram incubados por um período de cerca de 15 dias, nos quais foram mantidos constantes preferencialmente os seguintes parâmetros: temperatura 25 °C (± 2 °C), agitação de 110 rpm, 1500 Lux de intensidade de irradiação luminosa por períodos de 12 horas alternados com 12 horas no escuro. A intensidade de luz no interior do incubador foi avaliada diariamente, neste caso foi utilizado luxímetro digital Minip MLM 101. Para avaliação do crescimento algal foram coletadas amostras a cada 2 dias para análise por peso seco. A biomassa algal formada foi filtrada o vácuo em papel filtro de 50 μ m e em seguida lavada com água destilada e seca por 24 horas em estufa a 100°C, os resultados expressam a média de 2 determinações. Esse processo prévio de adaptação das microalgas ao caldo possibilitou a obtenção de resultados mais expressivos em termos de produtividade diária de biomassa, bem como, maiores taxas de redução de DBO e DQO, quando comparado com um processo no qual a alga não passou por essa adaptação prévia.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DO MEIO ESP UTILIZADO NO CULTIVO E ADAPTAÇÃO AO CALDO DE *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* OF C27.

Componentes	Solução Estoque (g/100ml)	Solução Nutritiva (ml)
KNO ₃	1	20
K ₂ HPO ₄	0,1	20
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	0,1	20
Extrato de solo*	-	30
Solução de	-	5
Micronutrientes**		
Água Destilada	-	905
Proteose-Peptona	-	1

PREPARO DO INÓCULO

O inóculo para o cultivo da *Botryococcus braunii* OF C27 em caldo pode ser realizado em diferentes modelos de frascos de vidros ou outro material transparente a luz. No experimento segundo a presente invenção foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 90 ml de caldo ou uma mistura de caldo + água. Os frascos contendo esse meio podem ser ou não esterilizados. No caso do experimento da presente invenção não foi realizada esterilização, sendo dito frasco inoculado com 10 ml de uma cultura ativa de *Botryococcus braunii* OF C27 adaptada em meio contendo ESP+caldo, de modo que a concentração inicial de biomassa algal atinja valores de no mínimo a 0,2 g/l. Processos similares poderão ser realizados empregando concentrações de biomassa algal superiores e/ou inferiores a essa, utilizando-se adaptação prévia da alga ao caldo ou não, porém o objetivo é sempre se ter um inóculo vigoroso e de boa qualidade para atender as necessidades da etapa seguinte do cultivo algal em caldo. Os frascos são transferidos para incubadora do tipo shaker e cultivados nas mesmas condições acima descritas. A biomassa algal obtida foi empregada para inocular os fotobiorreatores tubulares nas etapas seguintes.

CULTIVO BOTRYOCOCCUS BRAUNII OF C27 EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE

CALDO

A microalga *Botryococcus braunii* OF C27 é cultivada em caldo puro ou diluído em água como único substrato do meio de cultivo. Os fotobiorreatores foram preenchidos com 1,8l de caldo não esterilizado, inoculados com uma cultura ativa de *Botryococcus braunii* OF C27 de forma que a concentração de biomassa algal no início do cultivo seja da ordem 0,2 g/l. A agitação e aeração dos fotobiorreatores é realizada através de um fluxo de ar atmosférico de 1 v/v/m (volume de ar por volume de meio), utilizando-se canículas de vidro com pedras porosas em sua extremidade como forma

melhorar a difusão dos gases no meio líquido. Os experimentos são conduzidos em sala climatizada, com temperatura controlada na faixa de 30 °C (± 2 °C) através de uso de um condicionador de ar. Nessa sala são instaladas duas estufas com fotoperíodos para controle de tempo ciclométrico digital marca

5 Full Gauge, modelo PROGS I com alimentação direta de 220 VCA, contendo doze lâmpadas fluorescentes 20 Watts luz do dia. A iluminância dos fotobiorreatores é de 1500 Lux fornecida pelas lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, por um período de 12 horas, alternados com 12 horas de ambiente

10 escuro. O tempo de cultura é de cerca de 15 dias. O volume das culturas foi mantido constante pela reposição diária de água destilada para compensar as perdas por evaporação.

TABELA 8 – CULTIVO DA MICROALGA *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* OF C27 EM

CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE CALDO

Caldo	H ₂ O	Meio	Biomassa	Biomassa	Lipídios	Lipídios
(%)	Destilada	EPS	Algal	Algal	%	g/l
	(%)	Solução	Inicial (g/l)	Final		
		nutritiva		(g/l)		
25	75	-	0,203	2,985 $\pm$ 0,0 3	19,07	0,57 g/l
50	50	-	0,212	3,162 $\pm$ 0,1 5	15,05	0,47 g/l
75	25	-	0,195	4,18 $\pm$ 0,13	13,19	0,55 g/l
100	0	-	0,207	6,17 $\pm$ 0,44	11,04	0,68 g/l
-	-	100	0,212	1,322 $\pm$ 0,1 1	29,20	0,38 g/l

A biomassa algal formada foi filtrada a vácuo em papel filtro de 50

15 μ m e em seguida lavada com água destilada e seca por 24 horas em estufa a

100°C. Os resultados expressam a média de 2 determinações para cada experimento. Observa-se na Tabela 8 acima que o melhor resultado em termos de biomassa algal produzida após 15 dias de cultivo foi obtido com 100% de caldo puro (6,17 g/l). Porém, observa-se que nessa condição a porcentagem de lipídios presente na biomassa algal foi de 11,04%, valor inferior aos 19,07% obtido no experimento com caldo diluído em 75% de água. Entretanto, se os cálculos forem feitos em termos de produtividade dos lipídios por litro de meio de cultura utilizado, essa situação se inverte. Desta forma, observamos que a produção de lipídios foi 0,68 g/l quando *Botryococcus braunii* OF C27 foi crescido em um meio contendo 100% de caldo, frente a 0,57 g/l quando o meio era composto por 25% de caldo + 75 % H₂O. A quantidade de biomassa e lipídios produzidos pela microalga *Botryococcus braunii* OF C27 quando cultivada em caldo puro ou diluído foi superior em comparação ao meio (EPS-Solução nutritiva), referenciado na literatura como ideal para o cultivo dessa espécie de microalga (Tabela 8). Pelos resultados obtidos é possível concluir que o caldo residual proveniente do cultivo da levedura oleaginosa (Unidade 2) puro ou diluído, se constitui num excelente substrato para o cultivo da microalga *Botryococcus braunii* OF C27 visando à produção complementar de biomassa e lipídios, segundo o processo integrado objeto da presente invenção.

EFEITO DO CO₂ NO CULTIVO DE BOTRYOCOCCUS BRAUNII OF C27 EM CALDO

Na descrição acima é possível verificar que a produtividade de óleo em (g/l) é mais expressiva quando a microalga *Botryococcus braunii* OF C27 é cultivada em um meio contendo 100% de caldo. Assim, procurou-se avaliar o efeito do CO₂ na formação de biomassa e síntese de lipídio. Diferentes concentrações de CO₂ foram misturadas ao ar de alimentação dos fotobiorreatores tubulares durante o cultivo da *Botryococcus braunii* OF C27 em caldo puro. O CO₂ proveniente de um cilindro de gás é conduzido a um

misturador de gases, o qual é alimentado concomitantemente com ar, de forma que os gases na saída do misturador apresentem concentrações de 5%, 10% e 15% de CO₂. Os experimentos são conduzidos em bateladas de 15 (quinze) dias em fotobiorreatores tubulares de vidro com 52 cm de comprimento por 8 cm de diâmetro, com volume total de 2 litros (1,8 litros de volume útil). Todos os cultivos foram mantidos em agitação constante proporcionada por um fluxo de ar atmosférico filtrado de 1,0 v/v/m. Os cultivos foram iniciados com uma concentração celular algal da ordem de 0,20 g/l e foram mantidos durante o experimento sem correção ou ajuste de pH. Os volumes das culturas foram mantidos constantes pela reposição diária da água perdida por evaporação. As condições de inoculação e incubação dos fotobiorreatores foram as mesmas empregadas acima. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata e os resultados expressam a média dessas determinações.

TABELA 9 – EFEITO DA PRESENÇA DO CO₂ NO CRESCIMENTO DE *BOTRYOCOCCUS*

15

BRAUNII OF C27 EM CALDO

Condição de cultura	Biomassa Algal Inicial (g/l)	Biomassa Algal Final (g/l)	% Lipídio
Ar	0,207	6,17±0,44	11,04
Ar + 5% CO ₂	0,199	6,54±0,34	11,56
Ar + 10% CO ₂	0,197	6,74± 0,27	11,87
Ar + 15 CO ₂	0,205	6,68±0,53	12,79

Na Tabela 9 acima estão ilustrados os resultados obtidos. Constata-se que a adição de CO₂ exerce um efeito positivo na produção da biomassa e acúmulo de lipídios durante o cultivo da microalga de *Botryococcus braunii* OF C27 em meio à base de caldo residual da produção de biomassa de levedura oleaginosa. Quando se comparam os cultivos nos quais CO₂ foi misturado ao ar, com aquele que recebeu apenas ar atmosférico, percebe-se

20

que a maior concentração em termos de biomassa algal e lipídios acumulados (6,68 g/l de biomassa com 12,79% de lipídios) após 15 dias de cultivo em fotobiorreator tubular foi obtida com a mistura (Ar + 15% CO₂), enquanto com apenas ar, foi de 6,17 g/l. Certamente valores superiores e/ou inferiores a
5 esses poderão ser obtidos em cultivos da microalga *Botryococcus braunii* OF C27 ou com outros gêneros e espécies de algas quando cultivadas em caldo puro ou diluído, bem como em níveis de CO₂ que não testados nesse estudo.

RECICLAGEM DO SOBRENADANTE

O cultivo da microalga *Botryococcus braunii* OF C27 é realizado
10 reciclando-se o sobrenadante após separação, por exemplo utilizando filtragem. A reciclagem do sobrenadante é foi realizada nos mesmos fotobiorreatores acima descritos, alimentados em todos os experimentos com apenas uma mistura gasosa (Ar+15% CO₂), pois foi essa condição que forneceu os melhores resultados em termos de produção de biomassa e
15 acúmulo de lipídios, embora seja possível utilizar outras concentrações de CO₂. Assim, no processo da presente invenção, é previsto a reciclagem da fração líquida (sobrenadante) da primeira produção para utilização como meio de cultivo para uma segunda, uma terceira ou mais bateladas, até que o sobrenadante residual se encontre totalmente exaurido em seu nutrientes
20 originais.

Após cultivo e filtração, o sobrenadante pode apresentar pH alterado, havendo necessidade de sua correção para faixa ótima. A grande vantagem dessa recirculação, diz respeito ao fato de que, além do tratamento biológico conferido a esse resíduo altamente poluente, proveniente da Unidade
25 2, se consegue implementar a produção de lipídios destinados à produção de biodiesel e/ou óleo combustível. Na Tabela 9 abaixo podemos observar que com o passar dos ciclos, os macro e microelementos vão sendo consumidos, os níveis de DQO e DBO vão sendo significativamente reduzidos, chegando ao

final do terceiro ciclo com taxas muito próximas de zero. Fica, portanto, claramente observada a importância econômica e ambiental da recuperação do CO₂ gerado durante a produção de biomassa de levedura *Rhodospiridium toruloides* OF A25 e reutilização do mesmo na produção de biomassa da microalga *Botryococcus braunii* OF C27, se reaproveitado assim todos os

5 resíduos gerados na Unidade 2 em um circuito integrado.

TABELA 10 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA ALGAL AO LONGO DOS CICLOS DE RECUPERAÇÃO DE CALDO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA OLEAGINOSA

Tempo de Cultivo (dias)	Ar + 15% CO ₂ g/l	% Lipídio
0	0,211	-
15	6,68±0,53	12,79
30	4,54±0,34	15,74
45	1,94± 0,27	17,65

Na tabela 10 se constata que a reciclagem do sobrenadante interfere positivamente na taxa de acúmulo de lipídios do *Botryococcus braunii* OF C27, porém não na produção de biomassa.

10

TABELA 11 – REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE DQO E DBO DO CALDO PROVENIENTE DA UNIDADE 2 AO LONGO DOS CICLOS

	DQO (mg/l O ₂)	DBO (mg/l O ₂)
Início	23.414± 724	13.900±589
1º. Ciclo	4682±234	1210±65,7
2º. Ciclo	265±67	97±3,12
3º. Ciclo	24±1,57	< 5,0

As análises de DBO e DQO, cujos resultados estão listados na Tabela 11 acima, foram realizadas segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20ed.,1998,Hach Company e WTW. A

15

quantificação de lipídios totais presentes na biomassa algal foi determinada empregando-se a metodologia proposta por BLIGH & DYER (1959).

Ainda, de acordo com a presente invenção, o caldo residual poderá ser diluído em água, acrescido ou não de outras substâncias químicas tendo por finalidade ajustar seu pH ou ainda complementar determinados macros e micro-nutrientes. Também, se necessário, o caldo poderá ser decantado, filtrado ou clarificado utilizando-se carvão ativado ou agentes flocculantes, dependendo da concentração de sólidos em suspensão. Observa-se, igualmente, que a pasteurização ou esterilização do caldo não proporciona diferenças significativas na produção de biomassa e acúmulo de lipídios nos diferentes grupos de algas pesquisados, sendo, portanto, uma operação unitária dispensável, embora possa ser empregada quando se fizer necessário. De acordo com a presente invenção, essa mesma metodologia poderá ser empregada com outras algas e/ou cianobactérias que poderão ser cultivadas de forma isolada e/ou em co-culturas (linhagens combinadas) e são preferencialmente aquelas dos gêneros e espécies formadas pelo grupo *Euglena* sp. (*gracilis*), *Anabaena* sp. (*variabilis*, *cylindrica*, *hassali*, *planctonica*), *Dunaliella* sp. (*salina*, *bardawil*, *tertioleta*), *Achananthes orientalis*, *Amphora* (*delicatissima*, *cafeiformis*), *Ankistrodesmus falcatus*, *Chaetoceros* sp. (*muelleri*, *gracilis*, *muelleri subsalsum*), *Clorococcum* sp., *Chlorrella* sp. (*ellipsoidea*, *salina*), *Chromonas* sp., *Chrysosphaera* sp., *Cricophaera* sp., *Cryptomonas* sp., *Cyclotella* sp. (*meneghiniana*, *cryptica*), *Navícula* sp., *Amphiprora hyalina*, *Eustigmatophyte flagellate*, *Pleurochysis* sp., *Franceia* sp., *Gleocapsa* sp., *Gloeothamnion* sp., *Hymenomonas* sp., *Isochrysis* aff. *Galbana*, *Monoraphidium* sp., *Nannochloropsis* sp. (*salina*), *Navícula* (*saprophil*, *pseudotenelloides*, *biskanterae*, *acceptata*, *saprophila*, *pseudotenelloides*), *Nephrochloris* sp., *Nitzschia* sp. (*pusilla monoensis*, *elliptica*, *alexandrina*, *quadrangula*, *pusilla monoensis*, *inconspicua*, *microcephala*, *frustulum*,

hantzchianna, *intermedia*, *frustulum*, *communis*), *Ochromonas* sp., *Oocystis* sp. (*pusilla*), *Oscillatoria* sp. (*subborevis*, *limnetica*), *Phaeodactylum tricornutum*, *Platymonas* sp., *Pleurochrysis* sp. (*dentate*), *Prymnesiophyte* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Pyraminonas* sp., *Stichococcus* sp., *Synechococcus* sp.,

5 *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii*, *Nitzschia* sp., bem como seus mutantes e/ou linhagens modificadas geneticamente capazes de acumular lipídios em sua biomassa.

Essas algas e cianobactérias poderão também ser cultivadas em escala industrial. Diferentes formatos e tamanhos de tanques podem ser

10 utilizados, podendo ser abertos ou fechados, aerados ou não, agitados ou não, contínuos, semi-contínuos ou descontínuos, horizontais, verticais, do tipo raceway, de placas, tubulares, ovais, circulares, retangulares ou quadrados.

O cultivo de algas ou cianobactérias em reatores abertos é realizado em tanques naturais ou artificiais com volumes que podem variar

15 entre algumas dezenas de litros até vários milhões de litros. Esses reatores ocupam grandes áreas, podendo atingir em média 10.000m² ou mais, no caso de um único tanque horizontal ou vertical. O sistema mais comum de agitação emprega pás, que são agitadas mecanicamente, sendo que ditas pás são distribuídas em espaços regulares por toda a superfície do meio, ou então

20 localizadas nas extremidades ou no centro do reator. Em conjunto com a agitação por pás, pode ser injetado ar comprimido. Esse ar poderá ser filtrado ou não. Os reatores poderão ser fechados, através do uso de uma cobertura removível, porém essa cobertura deverá ser construída de um material transparente ou translúcido à luz natural ou artificial. Materiais apropriados são

25 plástico, acrílico e vidro.

No caso de produção industrial, o dióxido de carbono (CO₂) produzido na Unidade 2 - Produção de Biomassa Microbiana oleaginosa, é recuperado no topo dos biorreatores através de um coletor acoplado ao mesmo

e transferido através de tubulações até os tanques de produção de algas e/ou cianobactérias. O CO_2 é distribuído através de borbulhadores ou difusores apropriados instalados no meio de cultivo, de forma que a concentração de CO_2 na forma dissolvida no meio seja da ordem 0.1-30%. O CO_2 poderá ser comprimido e/ou purificado e estocado em reservatórios pressurizados antes de ser injetado nos tanques de cultivo de algas e/ou cianobactérias. No caso de serem purificados, os gases provenientes dos biorreatores de produção de biomassa microbiana oleaginosa (Unidade 2) passam através de duas torres lavadoras recheadas com espirais de cerâmica até chegar ao gasômetro. Nas ditas torres, em que o líquido de lavagem é água desaerada, ocorre a remoção quase que total de todas as impurezas solúveis em água. O líquido de lavagem retorna por bombeamento aos biorreatores de produção de biomassa microbiana (Unidade 2), podendo ainda ser enviados aos tanques de produção da biomassa algal. Do gasômetro, o gás é conduzido a um depurador contendo $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em solução, o qual oxida metabólitos voláteis tais como aldeídos, álcoois, entre outros, presentes no gás, que é então resfriado. Num segundo depurador, contendo H_2SO_4 , completa-se a oxidação e o gás é desidratado. O CO_2 que sai deste depurador arrasta um pouco de ácido que é eliminado numa torre recheada com coque, na qual circula uma solução de Na_2CO_3 . Quando o ácido é neutralizado, há liberação de CO_2 . O gás passa por um lavador contendo uma pequena porção de glicerina que tem por finalidade absorver os produtos oxidados e fornecer um gás inodoro que pode ser estocado sob compressão em tanques para ser utilizado no cultivo de algas e/ou cianobactérias.

A separação ou colheita da biomassa algal produzida poderá ser realizada de maneira contínua, semi-contínua ou descontínua, manual ou mecânica, floculada ou não, utilizando centrífugas, filtros, filtros prensa, peneiras, decantadores ou ciclones. Prefere-se, segundo o processo da

presente invenção, a centrifugação e/ou filtração. A biomassa algal poderá ser extrusada ou não, seca naturalmente ou em secadores de leito fixo ou móvel, ou ainda por atomização (spray-drier), ou tambor rotatório para extração posterior de lipídios. A biomassa oleaginosa algal recuperada poderá ainda, 5 alternativamente, ser submetida à uma etapa de rompimento celular e a seguir enviada a um misturador.

4ª ETAPA - PROCESSAMENTO DA BIOMASSA MICROBIANA OLEAGINOSA E/OU ALGAL

Tanto a biomassa oleaginosa como a biomassa algal produzida segundo o processo da presente invenção são separadas do caldo de cultura 10 da mesma forma, ou seja por centrifugação. Nos experimentos foi utilizada uma centrífuga marca Car Padberg Zentrifugenbau, modelo 241, 20.000rpm, capacidade, 250l/h. Após separação do caldo, as referidas biomassas foram lavadas duas vezes com água potável. Essas biomassas podem também ser separadas por outras operações unitárias, tais como decantação ou filtração, 15 embora a centrifugação possa figurar como o processo preferido na presente invenção. No caso presente, a biomassa foi processada por dois métodos distintos, com e sem secagem.

Secagem

A secagem das biomassas de levedura oleaginosa e algal foi 20 realizada em uma estufa à vácuo marca BTM Medical, Modelo Vacucell, com capacidade de 111 litros. A secagem foi realizada em temperatura de 60 °C, pressão de 500 mmHg e tempo de 24 horas. Após secagem, o teor de umidade dessas biomassas variaram entre 8,5-10%.

TRATAMENTO DA BIOMASSA ÚMIDA

25 As biomassas de levedura oleaginosa e algal recuperadas após centrifugação são enviadas para a Unidade 5 - Extração de Óleos (lipídios) e Liquefação Direta, conforme ilustrada na Figura 6. Alternativamente, a biomassa úmida ou seca poderá passar por um processo de rompimento

celular para facilitar a extração dos lipídios subsequentemente no extrator a base de solventes orgânicos. Esse rompimento celular poderá ser realizado através do uso de métodos mecânicos ou não mecânicos. Os métodos mecânicos consistem no uso de pressão, trituração ou ultrassom. Os métodos não mecânicos se baseiam fundamentalmente no uso de enzimas que provocam lise celular, como a lisozima ou outras, ou em métodos químicos pelo uso de detergentes ou ainda em métodos físicos, através do choque osmótico ou congelamento. As biomassas ainda umidas (em pasta) de natureza microbiana e algal submetidas ou não ao rompimento celular poderão ainda opcionalmente serem enviadas a um misturador onde são igualmente alimentados suportes naturais desidratados, tais como farelo de soja, proteína de soja concentrada, polpa cítrica e bagaço de mandioca, dentre outros. A adição desses suportes naturais à biomassa oleaginosa de levedura e/ou fungos filamentosos e/ou algal, tem por finalidade suprimir a etapa de secagem da mesma antes de ser conduzida ao extrator, bem como gerar um produto destinado ao consumo animal, após extração dos lipídios.

5ª ETAPA - EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS (LIPÍDIOS) E LIQUEFAÇÃO DIRETA

TERMOPRESSURIZADA

As biomassas das leveduras oleaginosa *Rhodospiridium toruloides* OF A25 e da microalga *Botryococcus braunii* OF C27, produzidas e processadas segundo a presente invenção, têm seus óleos (lipídios) extraídos através de dois processos distintos, em extrator tipo Soxhlet e por liquefação direta termopressurizada.

EXTRATOR TIPO SOXHLET SEMI-PILOTO

Um extrator semi-piloto baseado na metodologia Soxhlet, com câmara/vaso de extração contendo um volume de 3 litros é alimentado com 300 gramas de biomassa de levedura oleaginosa e algal moída com partículas de 0,1-1mm. A extração do óleo (lipídios) é feita nessa câmara através da

recirculação de 2,5 litros de n-hexano que percola através da biomassa contida no interior de um envoltório de papel de filtro. Como fonte de aquecimento da câmara é utilizado vapor fluente a 4 atm. A temperatura de extração empregada nesse extrator é de 95 °C, com um tempo de extração otimizado de 4 horas. Outros solventes e/ou condições de extração poderão ser testados nesse equipamento.

Análise dos óleos (lipídios)

Os óleos produzidos pela levedura *Rhodosporidium toruloides* OF A25 e pela microalga *Botryococcus braunii* OF C27 foram analisados conforme metodologia abaixo:

- 1- Metilação dos ácidos graxos presentes nas amostras das biomassas de levedura e algal utilizando o método Metcalfe, Smith & Pelka (1966);
- 2- Separação e detecção dos ácidos graxos presentes nas amostras utilizando um cromatógrafo marca Varian, modelo 3300, equipado com detector de ionização de chama, injetor tipo "split/splitless", com coluna Carbomax 20M. Os parâmetros da operação: temperatura do detector - 280°C ; temperatura do injetor - 250 °C ; temperatura da coluna - 110 °C (2 min), programação a 5 °C/min até 180 °C (7min), programação a 10 °C/min até 210 °C;
- 3- Gás de arraste, H₂ com fluxo na coluna de 1mL/min;
- 4- Gás "make up", N₂ (30mL/min); e
- 5- Técnica de injeção "split, razão 1:100.

O tempo de retenção (tr) e porcentagem(%) dos componentes foram obtidos através do integrador INTRALAB 4290 que é acoplado ao cromatógrafo.

A identificação dos ácidos graxos presentes em cada amostra foi feita através dos seguintes procedimentos:

- i) tempo de retenção e tempo de retenção corrigido (tr e trc) de ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras e padrões;

- ii) técnica da co-iluição (spiking) de padrões junto com amostra; e
- iii) comprimento equivalente de cadeia (ECL).

Os valores do ECL foram calculados segundo Miwa et al., 1960, Bano et al., 1988. Nas Tabelas 12 e 13 são apresentados a composição média (3 determinações) dos ácidos graxos presentes (em 3 amostras distintas) de óleos produzidos pela levedura oleaginosa *Rhodospiridium toruloides* OF A25 e pela microalga *Botryococcus braunii* OF C27.

TABELA 12 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA LEVEDURA *RHODOSPORIDIUM*

TORULÓIDES OF A25

Ácido Graxo	Carbono	g/100g
Mirístico	C 14:0	1,52 ± 0,07
Palmitico	C 16:0	22,73 ± 1,77
Palmitoleico	C 16:1	0,44 ± 0,04
Estearico	C 18:0	15,25 ± 2,01
Oléico	C 18:1	45,20 ± 1,89
Linoleico	C 18:2	11,44 ± 0,94
Linolenico	C 18:3	3,46 ± 0,41

10

TABELA 13 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* OF

C27

Ácido Graxo	Carbono	g/100g
Laurico	C 12:0	2,26 ± 0,16
Mirístico	C 14:0	2,92 ± 0,93
Palmitico	C 16:0	39,26 ± 3,77
Estearico	C 18:0	4,21 ± 0,644
Oléico	C 18:1	23,09 ± 1,98
Linoleico	C 18:2	13,44 ± 1,22
Alfa linolenico	C 18:3	14,79 ± 0,95

EXTRAÇÃO POR LIQUEFAÇÃO DIRETA TERMOPRESSURIZADA

Este processo é designado extração por liquefação direta termopressurizada (ELDT), em razão de que o extrator/reator opera com pressões superiores à atmosférica. Este acréscimo de pressão não é ocasionado pela injeção de um gás inerte, mas sim pela elevação acima do ponto de ebulição e vaporização do líquido no interior do vaso/reator. O reator é formado por um vaso de aço carbono revestido internamente em aço inox AISI 316. Este revestimento interno deve ser de aço inoxidável para não sofrer corrosão em virtude dos diversos sais que são adicionados ao caldo de fermentação que inevitavelmente estarão presentes em quantidades apreciáveis na biomassa úmida.

O extrator é constituído por um cilindro de 40 cm de comprimento, 20 cm de diâmetro externo e 15 cm de diâmetro interno, resultando num volume total de 7,0 litros. Internamente existem 3 chicanas anguladas entre si em 120° e com largura de 1 cm, o suficiente para elevar as esferas e fazê-las cair. O reator repousa sobre eixos horizontais que o movimentam a uma velocidade de 40 rpm, promovendo eficiente mistura entre solvente, biomassa e esferas de porcelana, propiciando uma melhora na eficiência do rompimento celular e facilitando a extração do óleo. 500g de biomassa de levedura oleaginosa e algal na forma de pasta com 70% de umidade são misturados com 2,1 litros de solvente e 50 esferas de porcelana. Nessas condições operacionais a taxa de ocupação do volume útil do reator é de aproximadamente 35%. O reator é lacrado, tendo início o processo de extração, que é realizada a uma temperatura de cerca de 120 °C, para o caso da utilização do n-hexano como solvente ou cerca de 145 °C para no caso do emprego do metanol. A pressão utilizada para ambos os tratamentos é de 7 bar, otimizadas previamente. Temperaturas e pressões superiores e/ou inferiores a essas poderão ser utilizadas. O tempo de extração é de 1h 30 min,

conforme condição otimizada, previamente.

Após término da extração, a fração sólida formada por detritos celulares é separada da fração líquida formada por óleo + solvente + água, por meio de filtração a vácuo em filtro Büchner com papel filtro de porosidade de 4µm. A fase sólida fica retida no filtro sendo desidratada e podendo ser utilizada como suplemento na alimentação animal. A mistura das fases orgânica e oleosa é encaminhada a uma funil de decantação. Após 1 hora as fases estão bem distintas. A camada superior é composta por uma mistura de óleo e solvente. Essa mistura é destilada para recuperação do solvente que poderá ser reciclado no processo, obtendo-se um óleo bruto viscoso de coloração escura.

TABELA 14 PROPRIEDADES DO ÓLEO OBTIDO POR LIQUEFAÇÃO DIRETA

TERMOPRESSURIZADA (ELDT)

Propriedades	OBL	OBM	* Óleo Combustível BPF (tipo A) ¹⁵
Densidade aparente (Kg/m ³)	957	945	970
Viscosidade Cinemática (mm ² /s)	194	189	620 (máx)
Ponto de Fulgor Min. °C	85	79	66 ° C (min) ²⁰
H ₂ O e Sedimentos (% Volume)	1.22	1,69	2,0% (máx)
Teor de enxofre	1,43	0,49	2,5% (máx)
Poder Calorífico Kcal/kg	**8598	**8429	9600 ²⁵

*Normas ANP, Portaria 80, ASTM E 29

OBL= Óleo bruto de levedura, OBM= óleo bruto de microalga

** Poder calorífico inferior

Na Tabela 14 acima são apresentadas as propriedades dos óleos microbiano e algal obtidos através do processo ELDT, segundo a presente invenção, em comparação com o óleo BPF (tipo A) derivado do petróleo. Os experimentos demonstram que esse óleo obtido de biomassa de levedura (OBL) e de microalga (OBM) se enquadram dentro das normas brasileiras (ANP, Portaria 80 e estrangeira ASTM) para essa classe de combustível destinado à geração de calor/vapor. O processo ELDT acima descrito possui grande potencial aplicativo na área da produção dos biocombustíveis, pois dispensa a operação de secagem da biomassa, que é considerada de grande impacto econômico. Desta forma, a presente invenção através de suas tecnologias integradas contempla a possibilidades de se optar pela via tecnológica que seja mais vantajosa economicamente e/ou do tipo do biocombustível que se deseja produzir, o biodiesel ou o óleo combustível para geração de vapor/energia.

Ainda, segundo o processo da presente invenção, a biomassa microbiana oleaginosa e/ou algal com alto teor de umidade pode, alternativamente, ser liquefeita em um reator sob pressão e temperatura, na presença de catalisadores químicos, preferencialmente na presença de álcalis. Durante a liquefação, o reator pode ser purgado com um gás inerte, tal como o nitrogênio, pois a purga impede a evaporação da água e auxilia na remoção do ar residual no equipamento. De acordo com a proveniência da biomassa (microbiana, algal ou suas misturas), o procedimento de liquefação direta termopressurizada pode durar de 5 minutos e 120 minutos, a temperatura interna do reator pode variar de 120 °C e 400 °C e a pressão interna pode variar de 1 MPa e 5 MPa. O material liquefeito obtido a partir desta técnica

possui alto poder calorífico, cerca de 5.000-11.500 Kcal/kg, dependendo do teor de lipídios presente na biomassa, bem como das condições empregadas no processo de liquefação e natureza do catalisador. O produto obtido poderá ser utilizado diretamente como combustível ou então pode ser misturado ao petróleo fóssil durante a operação de refino, com vistas a aumentar as frações de diesel e/ou gasolina. Poderá ainda ser enviado para uma nova etapa de extração líquido-líquido, com vistas à extração de hidrocarbonetos e subsequente produção de biodiesel.

6ª ETAPA - TRANSESTERIFICAÇÃO DOS ÓLEOS (LIPÍDIOS) POR CATÁLISE ÁCIDA

Os lipídios de biomassa oleaginosa de levedura e microalgal extraídos e analisados conforme acima descrito foram transesterificados segundo técnica descrita por Miao & Wu (2006).

As reações de transesterificação foram realizadas em frascos de vidro do tipo Becker com capacidade de 1 litro. Foi utilizando uma relação metanol:óleo de 56:1 e 100% H₂SO₄ como catalisador. Os frascos recobertos com papel de alumínio foram transferidos para uma estufa com temperatura controlada em 30 °C, sendo a reação de transesterificação conduzida sob agitação por um período de 4 horas. Após esse período, o produto da reação foi transferido para um funil de separação. A parte superior constituída de biodiesel foi separada e lavada com éter de petróleo e, na sequência, com água a temperatura 45 °C até a mesma se tornar neutra, demonstrando que ocorreu completa remoção da acidez residual da reação de transesterificação. O biodiesel foi então obtido por separação do éter de petróleo por destilação. A parte inferior do funil de separação é constituída basicamente por glicerina que é recirculada para o reator da Unidade 2, efetivando assim o ciclo de aproveitamento integral dos resíduos no processo segundo a presente invenção.

AValiação da Qualidade do Biodiesel Produzido

A Tabela 15 a seguir apresenta uma série de parâmetros do

biodiesel produzido a partir dos ésteres metílicos obtidos a partir das biomassas oleaginosas da levedura *Rhodosporidium toruloides* OF A25 e microalga *Botryococcus braunii* OF C27. Esses resultados foram comparados com amostras de diesel derivado do petróleo adquirida no mercado na cidade

5 de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil. Os resultados evidenciam que o biodiesel produzido através do processo da presente invenção apresenta uma qualidade próxima ao diesel derivado do petróleo, podendo ser empregado integralmente ou em mistura com esse combustível fóssil em motores tipo Diesel. Outra possibilidade é sua utilização como substituto ao

10 biodiesel produzido a partir de produtos agrícolas que são amplamente demandados na alimentação humana e animal, como por exemplo, a soja.

TABELA 15. COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO BODIESEL PRODUZIDO A PARTIR

DE ÓLEO DE LEVEDURA E MICROALGA COM DIESEL DERIVADO DO PETRÓLEO

Características	Método/Técnica Utilizadas	BL	BM	Diesel Comercializado Estado do São Paulo-Brasil
H2O+Sedimentos (% Volume)	ASTM D 1796	0,03	0,01	0,03
Cinzas (% Massa)	ASTM D 482	0,0	0,01	0,0
Densidade Relativa a 20-4 °C (Kg/m ³)	ASTM D 4052	875	869	852
Ponto de Fulgor (min, °C)	ASTM D 56	103	96	59
Viscosidade a 40 °C	ASTM D 445	5,3	5,2	3,5
Poder Calorífico Superior (Kcal/Kg)	ASTM D 240	9860	9275	11300
Índice de cetano	ASTM 4737 ANP Portaria 210/2001	46	45,5	44

ASTM: American Society for Testing and Materials

Segundo um outro aspecto da presente invenção, a transesterificação dos óleos provenientes de uma das sub-unidades de extração ou de liquefação direta, ou mesmo suas misturas, podem ser transesterificados com o uso de etanol, isopropanol, butanol ou quaisquer outros álcoois primários, anidros ou hidratados, ou suas misturas em quaisquer proporções estequiométricas de óleo/álcool. A temperatura da reação deverá variar de 25 °C a 120 °C. A Figura 7 ilustra um fluxograma da unidade de transesterificação, parte integrante do presente processo.

Nessa Unidade 6, a transesterificação poderá ainda ser realizada utilizando-se diferentes catalisadores químicos. Se a catálise for alcalina, pode-se utilizar o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou outros e, se a catálise for ácida, pode-se utilizar o ácido fosfórico, ácido clorídrico, o carbonato de cálcio ou outros. No caso de catálise enzimática, pode-se utilizar quaisquer enzimas classificadas como lipolíticas/lípases. De acordo com o catalisador utilizado no processo, deve-se aplicar o neutralizador correspondente na etapa de lavagem do biodiesel. A transesterificação pode também ser realizada utilizando-se co-solventes tais como o tetrahidrofurano ou outros, os quais irão aumentar a solubilidade do álcool primário utilizado. Neste caso, fica dispensada a neutralização, pois são recuperados juntamente com o álcool.

Além destas duas opções, há uma terceira, a reação de transesterificação em estado supercrítico, no qual a reação ocorrerá a temperaturas variando de 350 °C a 400 °C e pressões variando na ordem de 60 a 100 atm.

De um modo geral, a reação de transesterificação poderá ainda ocorrer em batelada ou em sistema contínuo. O catalisador, o co-solvente, o álcool e a biomassa processada poderão ser adicionados ao tanque de transesterificação conjuntamente ou poderão ser previamente misturados em

outra ordem utilizando-se tanques adicionais para estas misturas. A reação poderá ocorrer com ou sem catálise ácida, básica ou enzimática, homogênea ou heterogênea, com ou sem o uso de co-solventes, em estado supercrítico ou não e com ou sem agitação.

5 Após a etapa de transesterificação, o álcool utilizado poderá ser recuperado por processos de evaporação ou destilação flash, visando reduzir a solubilidade do glicerol no biodiesel. Caso seja utilizada transesterificação com co-solvente, nesta etapa ele será removido junto ao álcool.

10 Em seguida a etapa de transesterificação, é realizada a separação de fases, resultando em uma fase leve compreendendo o biodiesel (fase superior) e em uma fase pesada compreendendo o glicerol (fase inferior). A separação de fases poderá ocorrer naturalmente por decantação ou através da ação de um campo gravitacional centrífugo para acelerar este processo, podendo-se então utilizar uma centrífuga. Após a separação de fases, o glicerol
15 é retirado do sistema e recirculado como fonte de carbono para a produção de biomassa microbiana oleaginosa, no início do processo integrado segundo a presente invenção. O biodiesel assim obtido passa, alternativamente, por uma etapa de lavagem, visando a remoção de quaisquer impurezas ou de outros compostos químicos adicionados ao processo. Esta lavagem é realizada
20 utilizando-se diferentes proporções água/biodiesel e por qualquer método adequado. O efluente dessa etapa de lavagem consiste em uma mistura de água e catalisador, caso este tenha sido empregado na etapa de transesterificação.

25 O biodiesel purificado poderá então ser armazenado ou, desejando-se um produto com qualidade superior, pode-se ainda submetê-lo a uma etapa de evaporação da água remanescente.

 Como alternativa à produção de biodiesel, os lipídios provenientes da Unidade 5 - Extração de Óleos (lipídios) e Liquefação Direta

termopressurizada, conforme ilustrada na Figura 6 e acima descrita, podem ser utilizados diretamente na indústria. Vantajosamente, os lipídios provenientes da sub-unidade de liquefação direta podem ser utilizados como combustíveis para a geração de calor e/ou vapor, enquanto que os lipídios provenientes da sub-
5 unidade de extração, ou suas misturas com aqueles provenientes da sub-unidade de liquefação direta, podem ser utilizados como adjuvantes ao petróleo bruto ou suas frações pesadas provenientes do refino, o que proporcionará aumento nos rendimentos em gasolina, diesel e demais frações durante o refino ou craqueamento. A Figura 8 ilustra um fluxograma mostrando tais
10 alternativas.

Os técnicos no assunto perceberão, pela descrição acima, que o processo para a produção de biodiesel e/ou óleo combustível a partir de biomassa microbiana oleaginosa e/ou algal segundo a presente invenção é uma tecnologia inovadora, ecologicamente sustentável, que não gera qualquer
15 tipo de resíduo, proporcionando ainda a vantagem de liberar importantes volumes de oxigênio na atmosfera a partir dos tanques de produção de biomassa algal.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, caracterizado por compreender como matéria prima biomassa microbiana oleaginosa obtida a partir de derivados e resíduos da cana de açúcar, a qual pode ser integrada com biomassa algal e/ou com glicerol.

2. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender, em sua forma integrada, pelo menos uma etapa de produção de biomassa oleaginosa de leveduras e/ou fungos filamentosos a partir dos derivados e resíduos de cana de açúcar, uma etapa de produção de biomassa algal pelo aproveitamento integral dos resíduos, CO₂ e caldo residual, gerados na referida produção de biomassa oleaginosa, uma etapa de extração dos lipídios contidos nas ditas biomassas microbiana oleaginosa e algal, ditos lipídios sendo encaminhados diretamente para uso na geração de energia ou vapor, e/ou encaminhado para uma etapa de transesterificação para produção de biodiesel, da qual o glicerol residual é recirculado como matéria prima para produção da referida biomassa microbiana oleaginosa.

3. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a etapa de produção de biomassa microbiana oleaginosa é realizada com o uso da levedura *Rhodospiridium toruloides* OF A25.

4. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a etapa de produção de biomassa microbiana oleaginosa é realizada com o uso de uma ou mais dentre as leveduras e fungos filamentosos, modificados geneticamente ou não, escolhida do grupo consistindo de *Candida curvata*, *Candida guilhermondi*, *Candida tropicalis*,

Candida sp., *Candida oleophila*, *Candida lipolitica*, *Cryptococcus terricolus*,
Hansenula saturnus. *Hansenula ciferrii*, *Lipomyces starkei*, *Rhodotorula*
gracilis, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*,
Aspergillus ochraceus, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium*
5 *fulvum*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor miehei*, *Penicillium gladiololi*,
Penicillium javanicum, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium spinulosum*,
Penicillium ultimum, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula*
glutinis, *Trichosporon pullulans*, *Mortierella hygrophila*, *M. zychae*, *M. elengata*,
M. parvispora, *M. schmuckeri*, *M. alpina*, *Lipomyces lipofeeri*, *Lipomyces*
10 *tetrasporus*, *Williopsis saturnus*, *Candida diddensiae*, *Yarrowia lipolitica*,
Trichosporon cutaneum.

5. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU
ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo
fato de que a etapa de produção de biomassa algal é realizada com o uso da
15 microalga *Botryococcus braunii* OF C27.

6. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU
ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo
fato de que a etapa de produção de biomassa algal é realizada com o uso de
algas e/ou cianobactérias que poderão ser cultivadas de forma isolada ou em
20 co-culturas (linhagens combinadas) e são formadas pelo grupo consistindo de
Euglena sp. (*gracilis*), *Anabaena* sp. (*variabilis*, *cylindrica*, *hassali*, *planctonica*),
Dunaliella sp. (*salina*, *bardawil*, *tertioleta*), *Achananthes orientalis*, *Amphora*
(*delicatissima*, *cafeiformis*), *Ankistrodesmus falcatus*, *Chaetoceros* sp. (*muelleri*,
gracilis, *muelleri subsalsum*), *Chlorococcum* sp., *Chlorrella* sp. (*ellipsoidea*,
25 *salina*), *Chromonas* sp. *Chrysosphaera* sp., *Cricophaera* sp., *Cryptomonas* sp.,
Cyclotella sp. (*meneghiniana*, *cryptica*), *Navícula* sp. *Amphiprora hyalina*,
Eustigmatophyte flagellate, *Pleurochysis* sp., *Franceia* sp., *Gleocapsa*
sp., *Gloeothamnion* sp., *Hymenomonas* sp., *Isochrysis* aff. *Galbana*,

Monoraphidium sp., *Nannochloropsis* sp. (*salina*), *Navícula* (*saprophil*, *pseudotenelloides*, *biskanterae*, *acceptata*, *saprophila*, *pseudotenelloides*), *Nephrochloris* sp., *Nitzschia* sp. (*pusilla monoensis*, *elliptica*, *alexandrina*, *quadrangula*, *pusila monoensis*, *inconspicua*, *microcephala*, *frustulum*,
 5 *hantzchianna*, *intermédia*, *frustulum*, *communis*), *Ochromonas* sp., *Oocystis* sp. (*pusilla*), *Oscillatoria* sp. (*subborevis*, *limnetica*), *Phaeodactylum tricornutum*, *Platymonas* sp., *Pleurochrysis* sp. (*dentate*), *Prymnesiophyte* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Pyraminonas* sp., *Stichococcus* sp., *Synechococcus* sp., *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii*, *Nitzschia* sp., bem como seus
 10 mutantes e/ou linhagens modificadas geneticamente capazes de acumular lipídios em sua biomassa.

7. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de os derivados da cana de açúcar serem bagaço de cana de açúcar
 15 hidrolisado concentrado e detoxificado (BHCD), caldo, melaço, açúcar mascavo e/ou refinado.

8. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de o bagaço de cana de açúcar sofrer um pré-tratamento para alterar o
 20 tamanho e a estrutura das fibras lignocelulósicas, micro e macroscopicamente, e alterar a composição química e estrutura sub-microscópica das mesmas antes de ser hidrolisado, dito pré-tratamento sendo efetuado por meios físicos, físico-químicos, químicos, biológicos ou suas combinações, preferencialmente por meio de trituração mecânica ou moagem, sendo em seguida hidrolisado por
 25 meios químicos ou enzimáticos.

9. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de o bagaço de cana de açúcar pré-tratado, seco e com partículas de

cerca de 0,1-0,8mm, ser hidrolisado a cerca de 125 °C, por um período de cerca de 20 minutos, utilizando-se para cada 1 kg de matéria seca cerca de 120 gramas de ácido sulfúrico concentrado, com uma relação sólido líquido de 1:10, sendo o hidrolisado concentrado e detoxificado.

5 10. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com as reivindicações 2 ou 3, caracterizado pelo fato de ser preparado um inóculo da cepa *Rhodosporidium toruloides* OF A25 em meio YM (Yeast Medium) sólido, a qual é submetida ao crescimento em estufa a cerca de 30°C durante 5 dias e incubada por um período de cerca
10 de 72 horas, sendo dito meio YM composto por glicose (10g/l), peptona (5,0 g/l), extrato de levedura (3,0 g/l), extrato de malte (3,0 g/l), Agar (20 g/l) e pH 5,0.

 11. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com as reivindicação 2, caracterizado pelo
15 fato de a biomassa microbiana oleaginosa ser produzida em biorreator dotado de agitação mecânica, em um tempo de cerca de 24 horas a cerca de 150 horas, em uma relação carbono/nitrogênio variando de cerca de 0,5 a 500, um pH variando de 2,5 a 8,5 e uma temperatura na faixa de 10 a 50 °C, sendo o meio de cultivo aerado com um volume de ar na faixa de 0,1 a 5 v/v/m (volume
20 de ar por volume de meio por minuto).

 12. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com as reivindicação 2, caracterizado pelo fato de a produção de biomassa microbiana oleaginosa compreender:
- a preparação de um meio de pré-inóculo compreendendo cerca de 10 g/l de
25 glicose, 5 g/l de peptona, 3 g/l de extrato de levedura e 3 g/l de extrato de malte;
- a preparação de um meio de adaptação compreendendo 10 g/l de melaço de cana de açúcar, 5 g/l de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar concentrado

e detoxificado, 5 g/l de glicerol e 5 g/l de extrato de levedura; e

- um meio de propagação compreendendo cerca de 40 g/l de melaço de cana de açúcar, 30 g/l de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar concentrado e detoxificado, 30g/l de glicerol, 5 g/l de extrato de levedura, 2,5 g/l de uréia e 0,5 ml/l de anti-espumante, sendo todos esses meios desenvolvidos em um pH em cerca de 5,0.

13. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com as reivindicação 2, caracterizado pelo fato de a etapa de produção de biomassa algal compreender:

- 10 - a adaptação da microalga em caldo residual de biomassa microbiana oleaginosa, em cultivos incubados por um período de cerca de 15 dias, nos quais são mantidos uma temperatura de 25 °C (± 2 °C), agitação de cerca de 110 rpm, cerca de 1500 Lux de intensidade de irradiação luminosa por períodos de 12 horas alternados com 12 horas no escuro, sendo biomassa
- 15 algal formada filtrada, lavada com água destilada e seca por 24 horas em estufa a cerca de 100°C;
- preparação de inóculo para o cultivo da microalga em caldo residual de biomassa microbiana oleaginosa, ou uma mistura de caldo + água, sendo a concentração inicial de microalga adaptada com valores mínimos na ordem de
- 20 0,2 g/l; e
- ativação, por meio da cultura ativa (inóculo), de fotobiorreatores contendo caldo residual de biomassa microbiana oleaginosa, os quais são providos de agitação e aeração através de um fluxo de ar atmosférico de cerca de 1 v/v/m (volume de ar por volume de meio), com temperatura controlada na faixa de 30
- 25 °C (± 2 °C), ditos fotobiorreatores possuindo uma iluminância de cerca de 1500 Lux, por um tempo de cultura de cerca de 15 dias.
- injeção de dióxido de carbono residual da etapa de produção de biomassa microbiana oleaginosa nos fotobiorreatores, nos quais são borbulhado de modo

a atingir uma concentração na forma dissolvida no meio na ordem 0,1-30%; e
- separação ou colheita da biomassa algal produzida por centrifugação e/ou filtração.

14. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU
5 ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com as reivindicação 2, caracterizado pelo fato de as biomassas de levedura oleaginosa e algal passarem por um processo de rompimento celular para facilitar a extração dos seus óleos (lipídios) através de extrator tipo Soxhlet e por liquefação direta termopressurizada.

10 15. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com as reivindicações 2 ou 14, caracterizado pelo fato de os lipídios extraídos das biomassas oleaginosa microbiana e algal serem transesterificados para a produção de biodiesel segundo um processo no qual o glicerol residual é recirculado para alimentar o
15 biorreator de produção de biomassa microbiana oleaginosa.

16. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO COMBUSTÍVEL, de acordo com as reivindicações 2 ou 14, caracterizado pelo fato de os lipídios extraídos das biomassas oleaginosa microbiana e algal serem utilizados diretamente como combustíveis para a
20 geração de calor e/ou vapor, ou como adjuvantes ao petróleo bruto ou suas frações pesadas provenientes do refino.

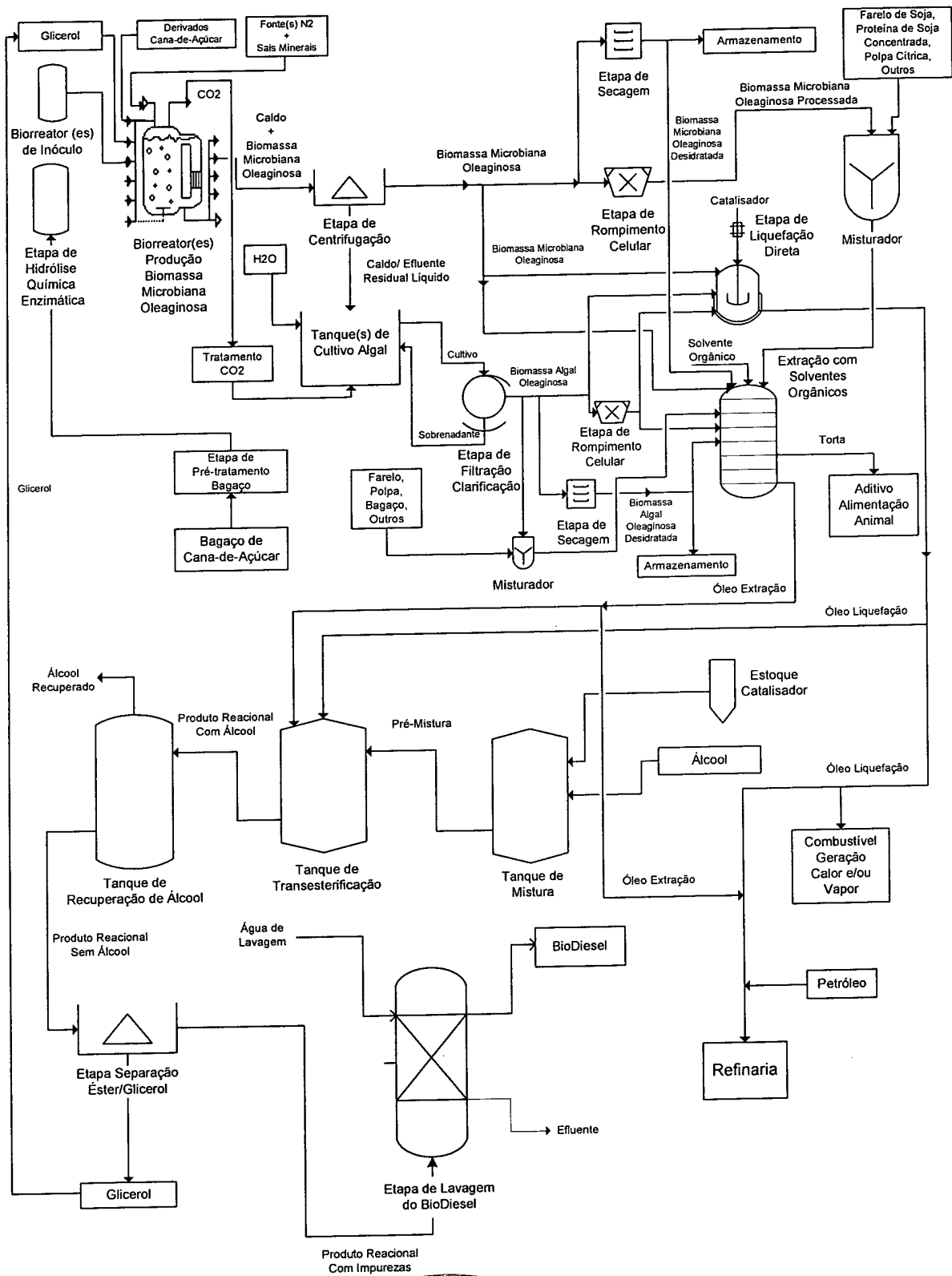
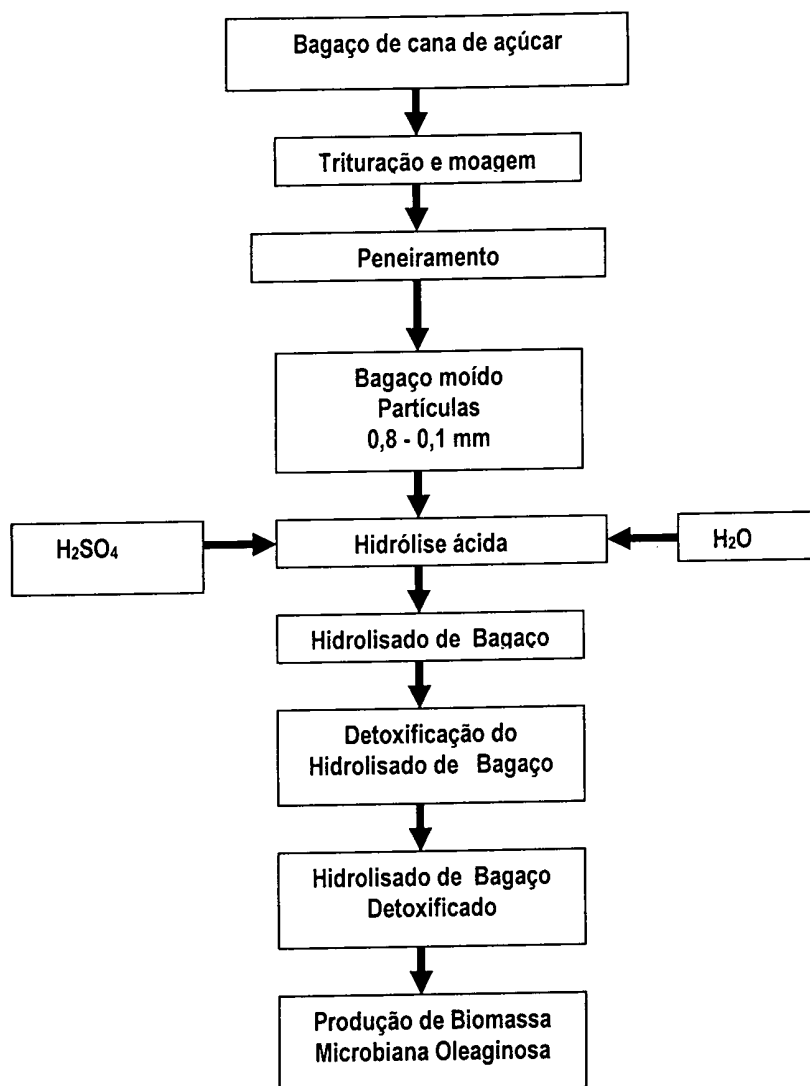


Figura 1

**Figura 2**

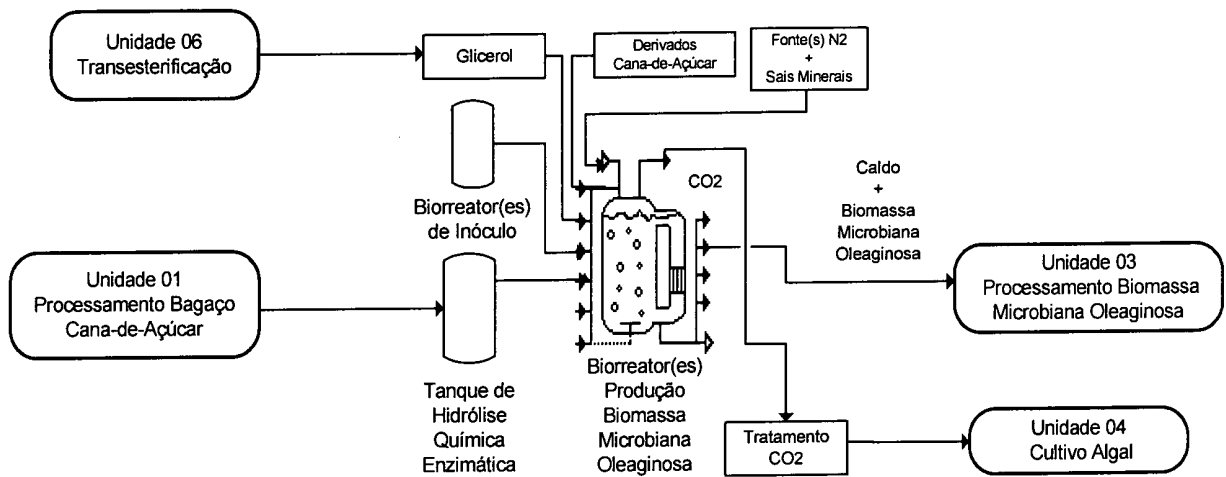


Figura 3

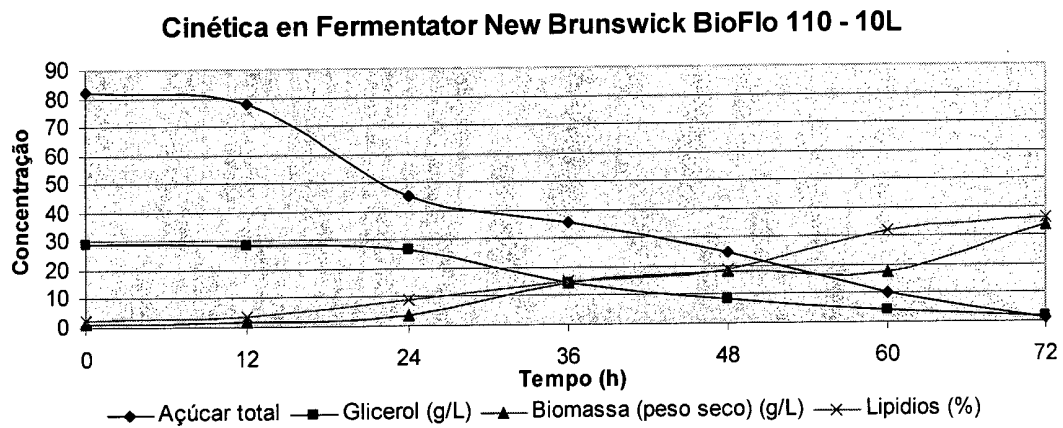
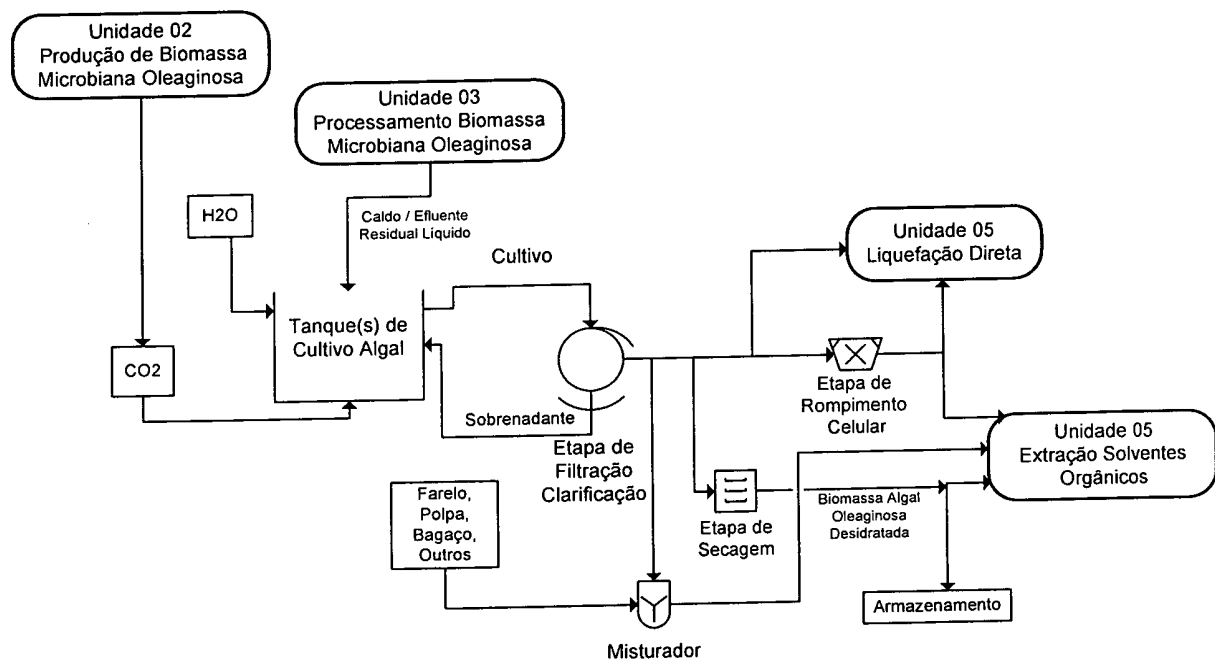
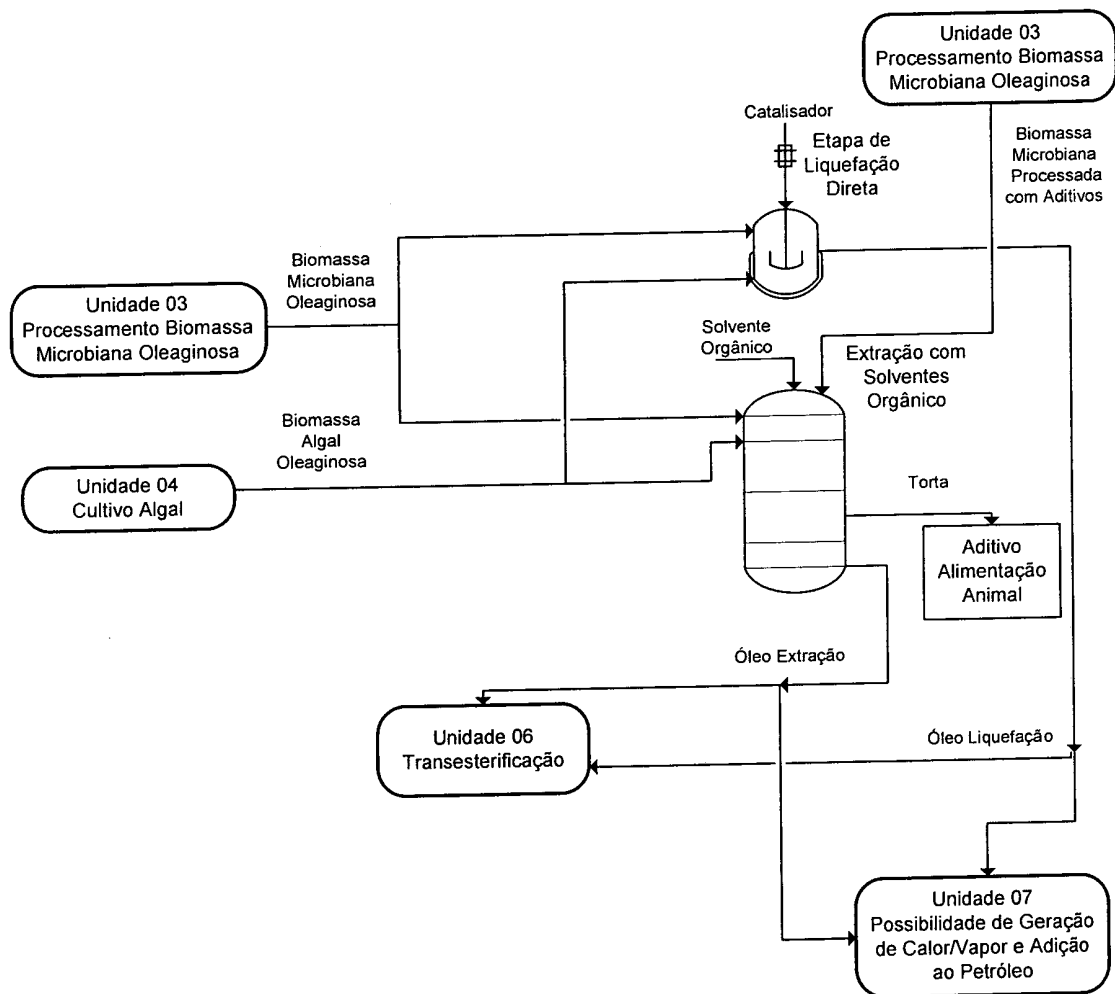
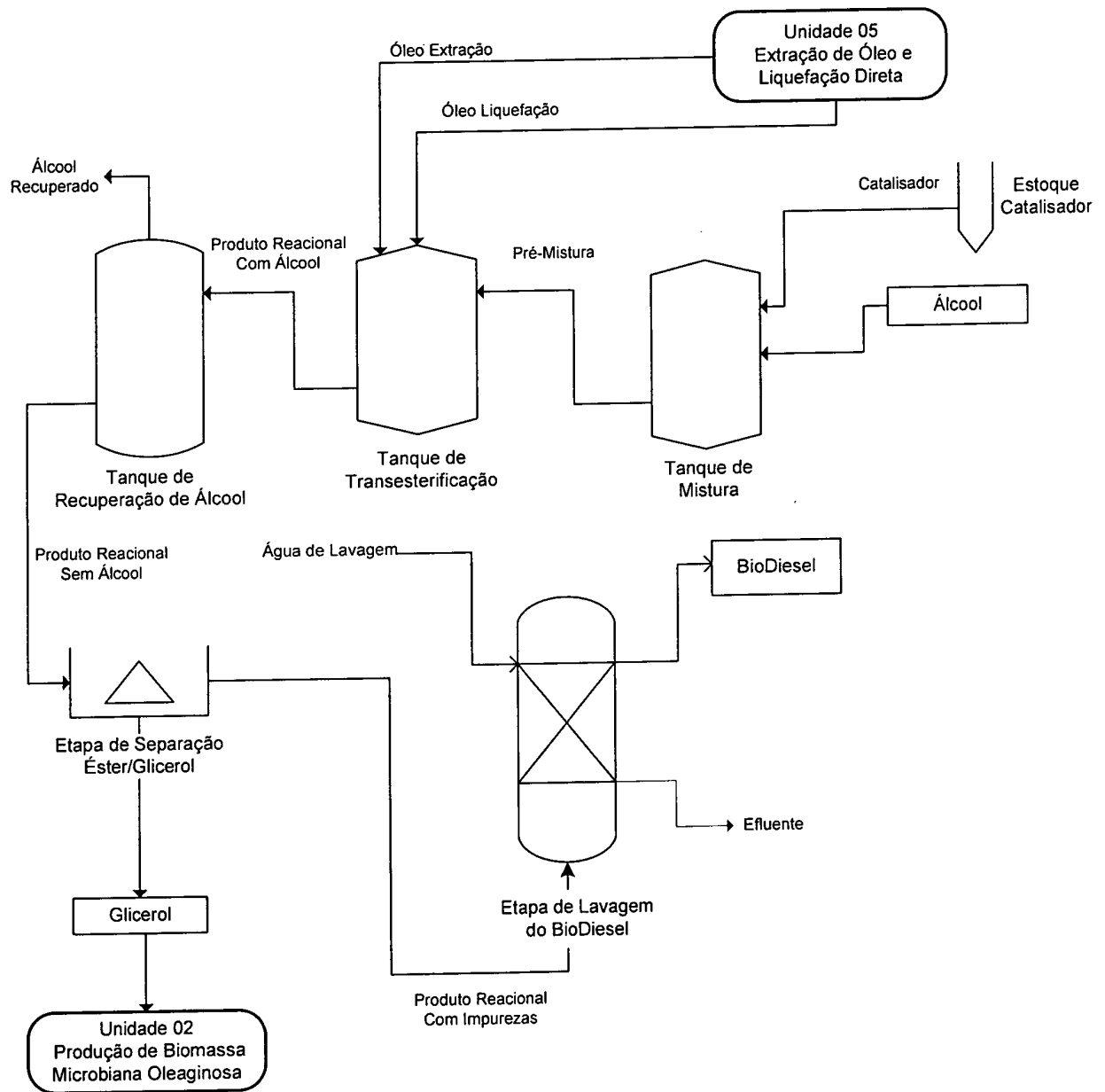


Figura 4

**Figura 5**

**Figura 6**

**Figura 7**

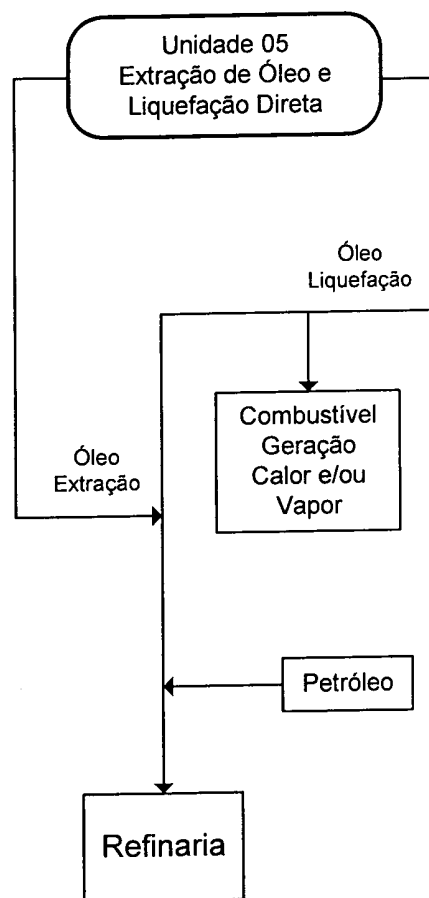


Figura 8

RESUMO**“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL E/OU ÓLEO
COMBUSTÍVEL”**

A presente invenção trata de um processo para a produção de
5 biodiesel e/ou óleo combustível a partir de biomassa microbiana oleaginosa
e/ou algal e/ou de derivados e resíduos da cana de açúcar. Os produtos objeto
da presente invenção são adequados para uso direto em motores e na geração
de energia ou vapor.

O processo integrado segundo a presente invenção compreende
10 a utilização, como matéria prima, biomassa microbiana oleaginosa obtida a
partir de derivados e resíduos da cana de açúcar, a qual é integrada com
biomassa algal e/ou com glicerol e são processadas através de etapas de
produção de biomassa microbiana oleaginosa de leveduras e/ou fungos
filamentosos, etapas de produção simultânea de biomassa algal pelo
15 aproveitamento integral dos resíduos, CO₂ e caldo residual da referida
produção de biomassa microbiana, bem como etapas de extração e
transesterificação dos lipídios contidos biomassa, com reutilização do glicerol
residual produzido. O processo descrito trata-se de tecnologia inovadora,
ecologicamente sustentável, que não gera qualquer tipo de resíduo,
20 proporcionando ainda a vantagem de liberar importantes volumes de oxigênio
na atmosfera.