



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

(21) **PI0611641-8 A2**

(22) Data de Depósito: 06/06/2006
(43) Data da Publicação: 28/09/2010
(RPI 2073)



* B R P I O 6 1 1 6 4 1 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*

A23K 1/00
C12N 1/16
C12N 1/22
C12P 7/10
C12P 21/00
A23K 1/12
A23K 1/06
C02F 3/34

(54) Título: **PROCESSO DE ENRIQUECIMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS EM PROTEÍNAS DE LÊVEDO**

(30) Prioridade Unionista: 07/06/2005 FR 05/05762

(73) Titular(es): INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D.), UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA (U.A.M.I.)

(72) Inventor(es): FIDEL DOMENECH, PIRRE CHRISTEN, SERGIO REVAH MOUSSEV

(74) Procurador(es): Tavares & Companhia

(86) Pedido Internacional: PCT FR2006001283 de 06/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/131643 de 14/12/2006

(57) Resumo: PROCESSO DE ENRIQUECIMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS EM PROTEÍNAS DE LÊVEDO. Trata-se de da utilização de melaço de cana-de-açúcar e de resíduo de destilaria, para a aplicação de um processo de enriquecimento de resíduo lignocelulósico, notadamente de bagaço ou de palha, em proteínas de lêvedo. A presente invenção se refere também a esse processo de enriquecimento de resíduo lignocelulósico, assim como o produto tal como obtido.



PI0611641-8

Relatório Descritivo da Patente de Invenção

“PROCESSO DE ENRIQUECIMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS EM PROTEÍNAS DE LÊVEDO”.

5 A presente invenção tem por objeto um processo de enriquecimento de um resíduo lignocelulósico, por exemplo de bagaço de cana-de-açúcar, em proteínas de lêvedo, compreendendo notadamente a utilização de melaço de cana-de-açúcar e de resíduo de destilação. Ela tem também por objeto o bagaço enriquecido tal como obtido.

10 Certos dejetos das refinarias de açúcar e das destilarias de álcool são nocivos para o meio ambiente. Com efeito, a indústria açucareira produz duas toneladas de bagaço de cana-de-açúcar, que é um resíduo sólido lignocelulósico fibroso oriundo da moagem da planta, por tonelada de açúcar refinado, o
15 que representa em Cuba 10 a 20 milhões de toneladas de bagaço por ano. Um outro subproduto poluente é o melaço de cana-de-açúcar que é um resíduo líquido muito rico em açúcares e em certos sais minerais. Além disso, as destilarias de álcool, freqüentemente associadas à produção de açúcar de cana, emitem
20 grandes quantidades de compostos voláteis mais ou menos nocivos para o meio ambiente (principalmente o etanol). As destilarias de álcool lançam também no meio ambiente resíduos muito poluentes, mas ricos em sais minerais. Assim, sempre em Cuba, se estima que 1600 toneladas de etanol, um composto cuja
25 emissão é submetida a controle, são lançadas cada ano na atmosfera.

Recentemente, em resposta a uma legislação cada vez mais estrita, numerosas pesquisas foram feitas para desenvolver processos biológicos de despoluição dos efluentes gasosos, simples, baratos, e particularmente bem adaptados ao
5 tratamento de grandes quantidades de ar ligeiramente contaminado (por exemplo, a biofiltragem).

Os processos anteriores de biofiltragem do etanol, a partir de bagaço de cana-de-açúcar compreendem a utilização de um meio mineral caro (33% do custo total do
10 processo), o meio mineral de Thomas et Dawson (ver composição no artigo Christen P, Domenech F, Michelena G. Auria R, Revah S (2002) Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse inoculated with *Candida utilis*. *Journal of Hazardous Materials*, 89(2/3): 253-265).

15 A presente invenção tem por finalidade fornecer um processo, permitindo, por um lado, valorizar o bagaço de cana-de-açúcar e, por outro lado, limitar as importantes emissões de etanol na atmosfera.

A presente invenção tem por finalidade fornecer
20 esse processo correspondente a um método de tratamento biológico eficaz e barato, que encontra aplicações na escala industrial, notadamente nos países tropicais produtores de açúcar de cana e/ou de álcool.

A presente invenção tem por finalidade fornecer
25 um processo no qual o levedo aumenta diretamente sobre um suporte lignocelulósico (bagaço, por exemplo) para produzir um

alimento para o gado. Ela não tem necessidade de ser cultivada em meio líquido em uma primeira etapa, separada desse meio (centrifugação ou filtração), antes de ser misturada ao bagaço.

5 A presente invenção se refere à utilização de melaço de cana-de-açúcar e resíduo de destilaria, para a aplicação de um processo de enriquecimento de resíduo lignocelulósico, notadamente bagaço ou de palha, em proteínas de lêvedo.

A expressão “melaço de cana-de-açúcar” designa um resíduo líquido muito rico em açúcares e em certos
10 sais minerais (Biar, Serrano e Conde, 1982, Ed. ICIDCA, La Havane, Cuba, “Estudio de las mieles de la cañade azúcar”).

No âmbito da presente invenção, o melaço de cana-de-açúcar é utilizado como meio de cultura para preparar o *inoculum* ativo, a partir de uma cepa de lêvedo forrageiro.

15 O resíduo de destilaria é tal como descrito no artigo de Obaya, Vald es e Ramos (1994, Acta Biotechnol, 14(2), 193-198) ou na referência “Manual de los derivados de la Caña de Azucar”, 3ª edición, Ciudad Habana, ICIDCA, 2000, capítulo 6.1. Editor: Luis Galvez Taupier.

20 O resíduo de destilaria é um efluente poluente ácido, rico em sais minerais comumente jogado em cursos d'água. No âmbito da presente invenção, o resíduo é utilizado como fonte de sais minerais.

O resíduo lignocelulósico é um resíduo sólido,
25 oriundo da moagem de plantas. Como exemplo de resíduo lignocelulósico, pode-se citar a palha, que designa de maneira

geral uma haste cortada de certas plantas, o feno, a serragem ou favos de beterraba de açúcar.

O bagaço é tal como descrito na referência: “Manual de los derivados de la Caña de Azucar”, 3ª edición, Ciudad Habana, ICIDCA, 2000, capítulo 2.2. Editor: Luis Galvez Taupier.

No âmbito da presente invenção, o bagaço, que é um subproduto da indústria açucareira, é utilizado como suporte sólido para o processo.

O processo de enriquecimento permite obter bagaço enriquecido em proteínas de lêvedo e contendo notadamente pelo menos aproximadamente 8% de proteínas em relação ao peso seco total do bagaço.

De acordo com um modo de realização vantajoso, a utilização, de acordo com a invenção, é caracterizada pelo fato de o processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo compreende uma etapa de preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis* com o melaço de cana-de-açúcar.

Por “cepa de lêvedo forrageira”, designa-se um lêvedo rico em proteínas de elevado valor nutricional, tal como descrita na referência “Manual de los derivados de la Caña de Azucar”, 3ª edición, Ciudad Habana, ICIDCA, 2000, capítulo 4.8. Editor: Luis Galvez Taupier. Dentre os microorganismos “Forrageiros”, podem-se citar também certos cogumelos

filamentosos (ou microscópicos) de tipo *Aspergillus*, ou o lêvedo *Saccharomyces cerevisiae* (lêvedo de padaria).

A presente invenção se refere também à utilização tal como definida acima, caracterizada pelo fato de o processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo compreende uma etapa de colocação em cultura do inoculum ativo, tal como definido acima, como resíduo de destilaria sobre o bagaço de cana-de-açúcar.

A presente invenção se refere também a um processo de enriquecimento de resíduo lignocelulósico, notadamente de bagaço, em proteínas de lêvedo, compreendendo as seguintes etapas:

- o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com melaço de cana-de-açúcar; e

- o acréscimo em contínuo ao resíduo lignocelulósico, notadamente ao bagaço de cana-de-açúcar, que foi colocado(a) em presença desse inoculum ativo com o resíduo de destilaria, de etanol, notadamente gasoso, ou de vapores de etanol, como fonte de carbono, permitindo o consumo do etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de resíduo lignocelulósico, notadamente bagaço, enriquecido em proteínas de lêvedo.

De acordo com um modo de realização preferido, a presente invenção compreende a utilização de uma cepa de *Candida utilis*, também, denominada *Torula utilis* (“Manual de los derivados de la Caña de azúcar”, 3ª edición,

Ciudad Habana, ICIDCA, 2000, capítulo 6.1. Editor: Luis Galvez Taupier).

De acordo com o processo da invenção, o inoculum ativo forma com o resíduo de destilaria uma mistura líquida que é em seguida misturada ao bagaço que serve de suporte sólido.

O processo da invenção é um processo aeróbico (que necessita da presença de oxigênio).

A presente invenção se refere também a um processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo, compreendendo as seguintes etapas:

- o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com melação de cana-de-açúcar;

- a colocação em cultura desse inoculum ativo com o resíduo de destilaria sobre o bagaço de cana-de-açúcar; e

- o acréscimo em contínuo ao bagaço de cana-de-açúcar, de etanol como fonte de carbono, permitindo o consumo de etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de bagaço enriquecido em proteínas de lêvedo.

De preferência, o etanol acrescentado em contínuo está em fase gasosa. Assim, o processo da invenção permite eliminar o etanol de uma atmosfera poluída por este.

A originalidade do processo da invenção se baseia na utilização de bagaço de cana-de-açúcar, que é um subproduto da indústria açucareira, de resíduo de destilaria que é

um efluente poluente, geralmente jogado em um curso d'água, rico em sais minerais e de vapores de etanol oriundos de perdas por evaporação, quando da fermentação alcoólica, para se obter um alimento para o gado, enriquecido em proteínas.

- 5 Com efeito, o bagaço é, às vezes, utilizado como alimento para o gado, à condição de ser completada em proteínas que podem ser de origem vegetal (soja) ou microbiana (lêvedos). Assim, o processo da invenção permite produzir um bagaço enriquecido em proteínas, a partir de um inoculum ativo.
- 10 Com efeito, o mais comum na técnica anterior é produzir o lêvedo em meio líquido, separá-lo do meio por centrifugação e em seguida misturá-lo ao bagaço.

- Para inseminar o bagaço, é preciso vantajosamente pelo menos 5×10^6 lêvedos por grama de bagaço seco, notadamente para diminuir o tempo de latência e ter um crescimento rápido e evitar uma possível contaminação microbiana.

- Para fixar as idéias, a taxa de multiplicação do inoculum ativo sobre o bagaço nas condições descritas anteriormente é de aproximadamente 100 em aproximadamente 7 dias.

De acordo com um modo de realização vantajoso, o processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo da presente invenção compreende as seguintes etapas:

- o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com de cana-de-açúcar.;

5 - a mistura do inoculum ativo tal como obtido na etapa precedente com o resíduo de destilaria;

- a colocação em presença da mistura, tal como obtido na etapa precedente, sobre o bagaço de cana-de-açúcar; e

10 - o acréscimo em contínuo ao bagaço de cana-de-açúcar, de etanol como fonte de carbono, permitindo o consumo do etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de bagaço enriquecida em proteínas de lêvedo.

Essa etapa de mistura de líquidos (resíduo de destilaria e inoculum ativo) em presença de um sólido (bagaço) permite homogeneizar mais facilmente os líquidos e o bagaço.

15 De acordo com um modo de realização vantajoso, o processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo da invenção compreende as seguintes etapas:

20 - o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com o melaço de cana-de-açúcar;

- o enchimento de um reator com bagaço de cana-de-açúcar, inoculum ativo, tal como obtido na etapa precedente e resíduo de destilaria; e

25 - a alimentação em contínuo desse reator cheio segundo a etapa precedente, com vapores de etanol, permitindo o

consumo desses vapores de etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de bagaço enriquecida em proteínas de lêvedo.

De acordo com um modo particular de realização, o bagaço é colocado em sacos em fibra sintética, podendo conter entre 3 e 17 quilogramas de bagaço úmido (correspondendo ao meio inicial) de uma malha suficiente para deixar passar e se propagarem os gases e bem apertada todavia para conter o bagaço e evitar que ele se disperse. Isto permite facilitar o manejo do bagaço úmido no momento de colocá-lo no reator e também, facilitar o manejo do produto acabado diretamente utilizável para o gado.

A presente invenção se refere também a um processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo, tal como definido acima, compreendendo as seguintes etapas:

15 - o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, como o melaço de cana-de-açúcar;

20 - o enchimento de um reator com o bagaço de cana-de-açúcar e inoculum ativo, tal como obtido na etapa precedente, colocado em cultura com o resíduo de destilaria; e

- a alimentação em contínuo desse reator cheio segundo a etapa precedente, com vapores de etanol, permitindo o consumo desses vapores de etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de bagaço enriquecido em proteínas de lêvedo.

A presente invenção se refere também a um processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo, tal como definido acima, compreendendo as seguintes etapas:

- 5 - o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com melaço de cana-de-açúcar;
- a mistura do inoculum ativo, tal como obtida na etapa precedente com resíduo de destilaria;
- 10 - o enchimento de um reator com a mistura tal como obtida na etapa precedente e o bagaço de canalização; e
- a alimentação em contínuo desse reator cheio, segundo a etapa precedente, com vapores de etanol, permitindo o consumo desses vapores de etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de bagaço enriquecida em proteínas de lêvedo.

15 No processo da invenção, não é necessário regular o pH do meio. Ao contrário, a acidificação observada (até um pH de 2,5) permite limitar a contaminação bacteriana.

Também, não necessário regular a temperatura. Com efeito, uma parte do excesso de calor metabólico é eliminada graças à recirculação do meio líquido, esta tendo por finalidade
20 primeira evitar a secagem do meio. Uma outra parte do calor metabólico é eliminada com a corrente gasosa que alimenta o reator.

De acordo com um modo de realização vantajoso, no processo da invenção, o bagaço decana é o bagaço fresco moído, cujas partículas têm um dia compreendido de
25

aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mm, e de preferência compreendido de aproximadamente 0,54 mm a aproximadamente 3 mm.

5 As partículas utilizadas são pequenas, a fim de dispor de uma área volumétrica específica a maior possível. Todavia, caso de trabalhe com partículas ainda menores, o pó (bagaço) será muito compacto, o que corre o risco de acarretar problemas de difusão dos gases (oxigênio e etanol) e resíduo de destilaria, através do suporte.

10 Um processo vantajoso, segundo a presente invenção, é caracterizado pelo fato de o melaço de canalização utilizado na etapa de preparo do inoculum é completado com nitrogênio, e notadamente sulfato de amônio e fosfato de amônio.

15 A utilização desses dois sais de nitrogênio permite aumentar a quantidade de lêvedo produzida. Com efeito, quando não se utilizam complementos, o melaço não é bem rico e o crescimento do lêvedo é menor.

20 De acordo com a presente invenção, o inoculum é produzido a partir de melaço de cana-de-açúcar, que é um subproduto da extração do açúcar. Ora, nos processos anteriores conhecidos, o meio de cultura utilizado é, por exemplo, uma solução de glicose e um extrato de lêvedo, que são ingredientes mais caros.

25 A presente invenção se refere também a um processo tal como definido acima, caracterizado pelo fato de a cepa de lêvedo é incubada em presença de aproximadamente 22 a

aproximadamente 82 g.L⁻¹, notadamente aproximadamente 42 a aproximadamente 62 g.L⁻¹, e, de preferência, aproximadamente 52 g.L⁻¹, de melaço, de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 g.L⁻¹, notadamente de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 g.L⁻¹, e, de preferência, aproximadamente 5,5 g.L⁻¹, de sulfato de amônio, e de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 g.L⁻¹, e, de preferência, aproximadamente 1,2 g.L⁻¹, de fosfato de amônio.

De acordo com um modo de realização vantajosos, a composição do meio para o inoculum é a seguinte (para um litro): 52 g de melaço (diluição: 1:17); 5,45 g de sulfato de amônio e 1,22 g de fosfato de amônio. Essa adaptação do meio de preparo do inoculum permite produzir um inoculum ativo, isto é, a fase de latência é curta e que, por conseguinte, o crescimento do lêvedo começa muito rapidamente sobre o bagaço, e ligeiramente mais denso (pelo menos $1,75 \times 10^8$ células/ml) do que quando se utiliza glicose e extrato de elevação para o preparo desse meio.

De acordo com um modo de realização vantajoso, o processo da invenção é caracterizado pelo fato de a etapa de incubação da cepa de lêvedo com o melaço de cana-de-açúcar é efetuada a uma temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 35°C, e, de preferência, igual a aproximadamente 30°C, durante um período que varia de aproximadamente 15 horas a aproximadamente 22 horas, e de preferência durante um período de aproximadamente 18 horas.

A presente invenção se refere também a um processo, tal como definido acima, caracterizado pelo fato de o resíduo de destilaria ser previamente enriquecido em sais de nitrogênio e em sais de magnésio, esse resíduo de destilaria sendo, de preferência, previamente enriquecido em sulfato de amônio, à razão de aproximadamente 73 g.L^{-1} , em fosfato de amônio à razão de aproximadamente 22 g.L^{-1} e em sulfato de magnésio à razão de aproximadamente 7 g.L^{-1} .

O fato de utilizar o resíduo de destilaria enriquecido em sulfato de amônio, em sulfato de magnésio e em fosfato de amônio permite um crescimento muito importante do lêvedo, o que acarreta um aumento da capacidade de eliminação dos vapores de etanol.

Um processo vantajoso, segundo a presente invenção, é caracterizado pelo fato de a cepa de lêvedo ser adicionada em água, a fim de se obter uma taxa de umidade de aproximadamente 60 a aproximadamente 75%, e de preferência de aproximadamente 65% em relação ao peso total do bagaço úmido.

Essa quantidade de água permite saturar o bagaço em água, o que favorece o crescimento do lêvedo.

De acordo com um modo de realização vantajoso, no processo da presente invenção, o reator é alimentado pelo etanol à razão de aproximadamente $10 \text{ g.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ de reator a aproximadamente $200 \text{ g.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ de reator, e de

preferência à razão de aproximadamente 150 a aproximadamente 200 g.h⁻¹.m⁻³ de reator.

Uma das particularidades do processo da invenção se baseia no fato de ser importante não ultrapassar uma
5 concentração em etanol de 10 g.m⁻³ na corrente gasosa. De preferência, a concentração em etanol está compreendida de 6 a 8 g.m⁻³ de ar. Essa faixa de concentração em etanol no ar que alimenta o reator deve limitar os fenômenos de inibição do metabolismo do lêvedo e a produção de metabólitos voláteis
10 intermediários que podem ser tóxicos (acetaldeído).

A presente invenção se refere também a um processo tal como definido acima, caracterizado pelo fato de a etapa de alimentação do reator em etanol ser feita em contínuo notadamente durante aproximadamente 7 dias à temperatura
15 ambiente.

De acordo com um modo de realização vantajoso, no processo segundo a presente invenção, o reator pode ser alimentado com etanol em fluxo descendente e/ou em fluxo ascendente.

20 De forma vantajosa, o reator é alimentado com etanol em fluxo descendente.

Com efeito, quando se alimenta o reator em fluxo ascendente, pode-se encontrar o seguinte problema: uma forte condensação do vapor de água próximo da saída do reator
25 (parte superior), o que acarreta uma perda de carga e favorece a contaminação microbiana.

Quando se alimenta o reator com fluxo descendente, os problemas de condensação na parte alta do reator desaparecem, pois a água que teria podido se acumular na base do reator é eliminada naturalmente por gravidade.

5 Também é possível utilizar em alternância o fluxo descendente e o fluxo ascendente, o que permite homogeneizar o crescimento do lêvedo por toda a altura do reator.

A presente invenção se refere também a um processo tal como definido acima, caracterizado pelo fato de a
10 parte superior do reator ser aspergida por uma solução de resíduo de destilaria, tal como definida acima, previamente enriquecida em sais de nitrogênio e em sais de magnésio, tais como definidos anteriormente.

De acordo com um modo de realização
15 vantajoso, a parte superior do reator é aspergida pelo resíduo de destilaria em excesso que é drenado em um cone situado na base do reator, por uma bomba ativada durante 5 minutos a cada hora. Esse líquido que recircula corresponde ao resíduo de destilaria inicialmente acrescentado ao bagaço. A bomba de recirculação
20 utilizada a uma vazão compreendida de 0,1 a 0,4 ml/minuto e, de preferência, igual a 0,25 ml/minuto.

De acordo com um modo de realização vantajoso, para prevenir os problemas de elevação da temperatura e da subsequente secagem, no sistema de umedecimento do meio,
25 a torre de umedecimento do ar que alimenta o reator é substituída por um umedecimento direto do meio por aspersão descontínua

por cima do reator. Isto tem por efeito diminuir os fenômenos de secagem (umedecimento mais eficaz) e controlar a elevação da temperatura graças à energia consumida, quando da evaporação dessa água. Além disso, trata-se de um método muito mais econômico do que o umedecimento prévio do ar.

Assim, o umedecimento por recirculação da fase líquida, associada à utilização de resíduo de destilaria complementada, conforme descrito acima, permite um crescimento mais considerável do lêvedo e um aumento da capacidade de eliminação do etanol.

A presente invenção se refere também a um processo tal como definido acima, caracterizado pelo fato de a água ser acrescentada pontualmente no decorrer do processo, notadamente em uma quantidade compreendida de 50 ml a 200 ml por litro de reator e por dia, o que corresponde a uma quantidade compreendida de 1 a 2 litros para um volume de meio de cultura de aproximadamente 16 litros.

De acordo com um modo de realização preferido, o processo da invenção é caracterizado pelo fato de compreender uma etapa final suplementar que consiste em secar com ar seco o produto final correspondente ao bagaço enriquecido com proteínas de lêvedo, e em recuperar o produto assim secado, isto a fim de facilitar sua estabilidade, sua conservação e seu eventual transporte.

Um processo vantajoso é um processo tal como definido acima, caracterizado pelo fato de o bagaço enriquecido

com proteínas de lêvedo apresentar uma taxa de proteínas de aproximadamente 5 a aproximadamente 17%, e, de preferência, de aproximadamente 17% em relação ao peso total de bagaço seco.

5 A presente invenção se refere igualmente a um produto tal como o obtido de acordo com o processo tal qual definido acima.

O processo da presente invenção pode notadamente ser utilizado principalmente no domínio ambiental, para permitir, por um lado, a redução da poluição dos cursos d'água, onde é derramado o resíduo de destilaria rico em sais minerais e com pH ácido (da ordem de 4) (Delbecq D, O açúcar, uma doçura amarga para meio-ambiente, Libération, 22 de novembro de 2004) e, por outro lado, para permitir a redução da poluição atmosférica pelos vapores de etanol oriundos das cubas de destilação (essa molécula volátil, embora considerada como pouco tóxica, constitui, no entanto, o objeto de uma legislação na Europa: um indivíduo não deve ser exposto durante mais de 8 h a uma concentração de 1000 ppm no ar (Cioci F, Lavecchia R, Ferranti MM (1997) High-performance microbial removal of ethanol from contaminated air. Biotech. Techniques, 11:893-898)).

O processo da presente invenção pode igualmente ser utilizado no domínio alimentar, considerando-se que o produto acabado constitui um alimento para o gado (ruminantes) rico em fibra e enriquecido com proteínas. Ele é

particularmente interessante nos países que têm um déficit de proteínas na alimentação animal (Cuba, Índia) e/ou produtores de cana de açúcar (Brasil, Índia, Cuba, México, etc.).

PARTE EXPERIMENTAL

5 A presente invenção resulta de experiências que consistem em testar as capacidades de várias cepas do lêvedo *Candida utilis* para:

- eliminar o etanol (emitido pelas destilarias de álcool, cervejarias ou as padarias industriais) e transformá-los em
- 10 CO₂ e H₂O (oxidação total) graças a um processo de biofiltragem,
- e/ou utilizar esse etanol a fim de produzir biomassa (proteínas unicelulares) para a alimentação animal.

As experiências feitas no âmbito da presente invenção foram realizadas na escala piloto. Mais exatamente, elas

15 foram efetuadas com um reator piloto de 20 litros.

Durante os primeiros testes, a CE (capacidade de eliminação) do etanol média observada é de 120 g/h.m³ de etanol (período de 12 dias) e no 16^o dia, a biomassa produzida é da ordem de 129 g/kg de bagaço. A CE dos vapores de etanol é

20 calculada, de acordo com a seguinte equação:

$$CE = (C_2 - C_s) * F / V \quad (1)$$

Com CE: capacidade de eliminação (g/h.m³)

Ce e Cs: concentração de etanol na entrada e na saída do reator (g/m³)

25 F: aeração (m³/h)

V: volume do reator (m³)

De acordo com um modo de realização preferido, o sentido da alimentação com ar + etanol foi invertido (fluxo descendente). Os problemas de condensação na parte alta do reator desapareceram, e na base do reator, a fase líquida (água e/ou resíduo de destilaria) que teria podido se acumular é eliminada naturalmente por gravidade.

De acordo com um outro modo de realização preferido, a torre de umedecimento do ar que alimenta ao reator é substituída por um umedecimento direto do meio por aspersão descontínua pelo alto do reator. Isto tem por efeito diminuir os fenômenos de secagem (umedecimento mais eficaz) e controlar a elevação da temperatura graças à energia consumida, quando da evaporação dessa água. Além disso, é um método de umedecimento do meio muito mais econômico do que o umedecimento do ar que necessita de uma torre de um volume equivalente àquele do reator.

Por outro lado, considerando-se o custo do meio mineral de Thomas e Dawson (Christen P, Domenech F, Michelena G. Auria R, Revah S (2002) Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse inoculated with *Candida utilis*. *Journal of Hazardous Materials*, 89 (2/3): 253-265), esse meio mineral foi substituído pelo resíduo de destilaria produzido quando da fermentação alcoólica que utiliza o melaço de cana-de-açúcar como substrato. O resíduo de destilaria é um efluente ácido e rico em sais minerais comumente lançado nos cursos de água, poluindo-os. Ele é utilizado a uma proporção de 1,04 L por kg de

bagaço e devidamente completado por fontes baratas de nitrogênio (sulfato de amônio, 73 g/l e fosfato de amônio, 22 g/l) e de magnésio (sulfato de magnésio, 7 g/l).

5 Essas duas modificações (umedecimento por recirculação da fase líquida e utilização do resíduo de destilaria complementado) permitiram um crescimento mais importante do lêvedo no módulo de entrada (356 g/kg de bagaço), assim como um aumento da CE do etanol (eliminação de 99,8 % de uma carga de 186 g.h.m⁻³).

10 De acordo com um modo de realização preferido, utilizou-se um fluxo de aeração mais importante sem modificar a carga (o que implica em diminuir a concentração de etanol na entrada a valores da ordem de 8 g/m³). Essa concentração relativamente menor em etanol no ar que alimenta o
15 reator deve limitar os fenômenos de inibição do metabolismo do lêvedo e a produção de metabólitos voláteis intermediários podendo ser tóxicos (acetaldeído). Esse modo de realização permite assim evitar uma grande heterogeneidade longitudinal da concentração em biomassa no reator, com um crescimento do
20 lêvedo muito mais considerável no módulo de entrada do etanol (356 g/kg de bagaço) do que no módulo de saída (76 g/kg de bagaço), que tem por conseqüência um funcionamento parcial do reator em termos de CE, com mais de 85 % do etanol eliminado no módulo de entrada e somente 2 % no módulo de saída
25 (observado quando do terceiro teste desse reator piloto).

O aumento do fluxo de ar permitiu melhor repartição do consumo do etanol (57,5 % no módulo de entrada, e 8,9 % na saída) e da biomassa produzida (208 e 81 kg de bagaço nos módulos de entrada e de saída respectivamente). A CE média do sistema é de 161 g.h.m^{-3} .

De acordo com um outro modo de realização preferido, o reator é alimentado de forma alternada com ar + etanol: um dia em dois por cima e um dia em dois por baixo. Assim, esse modo de realização permite melhorar ainda a homogeneidade do crescimento no reator.

Considerando-se os grandes volumes de inoculum necessários para inocular o meio (0,57 l/kg de matéria seca), foi decidido produzir o inoculum a partir de melaço de cana-de-açúcar, subproduto da extração do açúcar, ao invés da solução de glicose e de extrato de lêvedo utilizada na escala laboratório, muito mais onerosa. A composição do meio para o inoculum é a seguinte (por litro): melaço, 52 g (diluição 1:17); sulfato de amônio, 5,45 g; fosfato de amônio, 1,22 g. Essa mudança permitiu produzir um inoculum todo ativo e mais denso do que o precedente ($1,75 \times 10^8$ células/ml contra $1,53 \times 10^8$ células/ml) em uma duração idêntica (22 h) e a um custo menor.

EXEMPLO

Etapas essenciais do processo

1. Preparo do bagaço: toma-se o bagaço, de preferência, fresco, que mói para serem obtidas partículas inferiores a 20 mm;

2. produção do inoculum em meio líquido a partir do melaço devidamente completado em sulfato de amônio e fosfato de amônio (incubação entre 15 e 20 horas), para se obter o inoculum ativo ao cabo de 14 horas (aproximadamente de 14a 18 5 horas);

3. preparo do meio de cultura “sólido” sobre o bagaço, misturando-se o inoculum ativo, o resíduo de destilaria previamente enriquecido em sais de nitrogênio e de magnésio e a quantidade de água necessária para se obter uma umidade de 10 65%;

- enchimento do reator e alimentação com vapores de etanol por fluxo ascendente ou descendente; e

5. recirculação periódica da fase líquida (5 min cada hora).

15 Produtos de partida

Com exceção do lêvedo, podem todos ser considerados em diversos graus como exemplos de subprodutos poluentes da indústria agro-alimentícia: destilarias (resíduo de destilaria e vapores de etanol), refinarias de açúcar (bagaço de 20 cana).

O melaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado como meio de cultura para a produção do inoculum de partida.

O lêvedo empregado por ser *Candida utilis*.

Produto final

Bagaço de cana enriquecido com proteínas de lêvedo para a alimentação para o gado (teor mínimo: 8 % de proteínas).

Proporções de cada constituinte

5 Com base em um kg de bagaço (seca), se utilizam:

resíduo de destilaria 1,041

Sulfato de amônio 76 g

Fosfato de amônio 23 g

10 Sulfato de magnésio 7,3 g

Vapores de etanol, a carga não deve ultrapassar 200 g.h.m³

Melaço (para o preparo de inoculum) 32,4 g

Descrição detalhada

15 Um bioreator de 20 litros, composto de 3 módulos em plexiglas subiu (Aizpuru A., Dunat D., Christen P., Auria R., Garcia-Peña I., Revah S. (200 5) Fungal biofiltration opf toluene on ceramic rings. Journal of Environmental Engineering, 131: 396 - 402).

20 Volume útil do reator: 19,83 L; composto de 3 módulos (volume de cada um: 6,61 L; diâmetro: 18 cm; altura: 26 cm).

25 O ar é alimentado graças a uma bomba e o fluxo de ar é regulado por medidor de vazão equipado com uma válvula com punção. O mesmo acontece com o ar que borbulhar em um recipiente contendo o etanol (líquido). O ajuste desse fluxo

permite fixar com precisão a concentração em etanol no ar que entra no reator.

Cada módulo é equipado com um porto de retirada de amostrar do suporte (bagaço) no meio de cada módulo, a fim de seguir a evolução do pH, da umidade e do crescimento do lêvedo. Este é determinado por contagem das células ao microscópio e pela determinação de proteína total pelo método de Barnstein (Winton A.L. e Winton K.B., 1983, Metodos químicos generales: proteínas. Análisis de los Alimentos. Editorial Pueblo Y Educación, La Havane, Cuba). Cada módulo é também equipado de portos de amostras do ar (entrada e saída), a fim de determinar as concentrações de etanol, de CO₂ e de eventuais metabólitos voláteis (acetaldeído e acetato de etila) no ar. Isto permite seguir o comportamento do reator e no fim da experiência fazer um balanço carbono.

Funcionamento

A mistura ar + etanol é alimentada no reator em contínuo seja em um único sentido (ascendente ou descendente), seja de forma alternada. De forma periódica, asperge-se o topo do reator com água e às vezes (no caso em que se observa uma diminuição da eficácia de eliminação do etanol), uma solução de resíduo de destilaria diluída e complementada em N e P pode ser acrescentada. O lêvedo consome o etanol e o transforma em biomassa - tanto que não aparece uma limitação de um dos nutrientes - e em CO₂. O processo não necessita nem de regulagem de temperatura, nem regulagem de pH.

Quando o crescimento é concluído (ao cabo de uma semana aproximadamente) passa-se do ar seco no reator a fim de secar o produto e melhorar seu tempo de conservação.

Uma das vantagens desse processo é que o 5 lêvedo produz ácidos (em particular o ácido acético) que baixam o pH do meio a valores de 2,5 a 3, o que limita muito a contaminação do meio por outros microorganismos (bactérias em particular).

RESULTADOS

10 Várias experiências foram feitas e os resultados obtidos são os seguintes:

Condições operacionais

Umidade inicial do bagaço 65 %

Taxa de inoculação 1,78 x 10⁶ lêvedos /

15 bagaço

pH inicial 6

O meio de cultura tem a seguinte composição:

Bagaço seco (1 kg)

Resíduo de destilaria (1,04 l);

20 Solução mineral 1 (490 ml)

Solução mineral 2 (49,2 ml)

Inoculum (622 ml).

A solução mineral 1 tem a seguinte composição (para 1 l): 155 g de (NH₄)SO₄ e 46,78 g de (NH₄)₂HPO₄.

25 A solução mineral 2 tem a seguinte composição (para 100 ml): 14,88 g de MgSO₄.

O bagaço é lavado, secado e peneirado (diâmetro de partículas entre 0,54 e 3 mm) e esterilizado 1 hora a 121°C. Ele é em seguida misturado de forma não estéril aos sais, resíduo de destilaria e inoculum e introduzido no reator.

5 O reator é em seguida alimentado com etanol (corrente descendente) com uma carga de aproximadamente 200 g/h.m³ durante 10 dias, depois de 150 g/h.m³ nos 6 dias seguintes. Para isto, o fluxo de ar alimentado variou de 480 a 1200 L/h e a concentração em etanol no ar variou de 2 a 9 g/m³.

10 A eficácia de eliminação (EE) é de 100 % durante os 6 primeiros dias, depois caiu até 60 % no 7º dia. A fim de restabelecer essa EE, acrescentou 1 l de solução mineral, contendo 59,3 g de (NH₄)SO₄ e 17,9 g de (NH₄)₂HPO₄ e 5,66 g de MgSO₄. Acrescentou-se também 1 l de água estéril por dia no
15 reator a fim de compensar a água perdida por evaporação e assim evitar a secagem do meio.

Ao longo da experiência, obteve-se uma capacidade de eliminação (CE) que varia de 130 a 220 g/h.m³. A biomassa máxima foi atingida ao cabo de 8 dias com os seguintes
20 teores em proteínas: 13,7; 5,8 e 5,1 g para 100 g de bagaço seco, nos módulos de entrada, do meio e de saída, respectivamente, seja um teor médio de 8,2 g para 100 g de bagaço seco no conjunto do reator. O pH final é de 2,6; 2,5 e 2,3 nos módulos de entrada, do meio e de saída, respectivamente.

25 *Produção do inóculum:*

A cepa de levedo (uma ose) é introduzida em um Erlenmeyer contendo o melão (52 g/l) e completada em sulfato de amônio (5,45 g/l) e fosfato de amônio (1,22 g/l). O recipiente é em seguida colocado sobre um incubador de agitação orbital (200 rpm) a 30°C. Taxa de inoculação: $1,78 \times 10^6$ levedo/g bagaço.

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de melaço de cana-de-açúcar e de resíduo de destilaria, para a aplicação de um processo de enriquecimento de resíduo lignocelulósico, notadamente de
5 bagaço ou de palha, em proteínas de lêvedo.

2. Utilização, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo compreende uma etapa de preparo de inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de
10 lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis* com melaço de cana-de-açúcar.

3. Utilização, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de o processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo compreende uma etapa de
15 colocação em cultura do inoculum ativo, tal como definido na reivindicação 2, com a velocidade de destilaria sobre bagaço de cana-de-açúcar.

4. Processo de enriquecimento de resíduo lignocelulósico, notadamente de bagaço em proteínas de lêvedo,
20 compreendendo as seguintes etapas:

- o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com melaço de cana-de-açúcar; e

- o acréscimo em contínuo ao resíduo
25 lignocelulósico, que foi colocado em presença desse inoculum ativo com o resíduo de destilaria, de etanol, notadamente gasoso,

como fonte de carbono, permitindo o consumo do etanol pelo levedo mencionado e a produção de resíduo lignocelulósico enriquecido em proteínas de levedo.

5 5. Processo de enriquecimento de resíduo lignocelulósico, notadamente de bagaço em proteínas de levedo, compreendendo as seguintes etapas:

- o preparo de inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de levedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com melaço de cana-de-açúcar;

10 - a colocação em cultura desse inoculum ativo com o resíduo de destilaria sobre o resíduo lignocelulósico, notadamente sobre o bagaço de cana-de-açúcar; e

- o acréscimo em contínuo ao resíduo lignocelulósico, notadamente ao bagaço de cana-de-açúcar, de etanol como fonte de carbono, permitindo o consumo do etanol pelo levedo mencionado e a produção de resíduo lignocelulósico enriquecido em proteínas de levedo, notadamente de bagaço enriquecido em proteínas de levedo.

20 6. Processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de levedo, de acordo com a reivindicação 4, compreendendo as seguintes etapas:

- o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de levedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com melaço de cana-de-açúcar;

25 - a mistura do inoculum ativo tal como obtido na etapa precedente com resíduo de destilaria;

- a colocação em presença da mistura tal como obtido na etapa precedente sobre o bagaço de cana-de-açúcar; e

- o acréscimo em contínuo ao bagaço de cana-de-açúcar, de etanol, notadamente gasoso, como fonte de carbono, permitindo o consumo do etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de bagaço, enriquecido em proteínas de lêvedo.

7. Processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo, de acordo com a reivindicação 4, compreendendo as seguintes etapas:

10 - o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com melaço de cana-de-açúcar;

- o enchimento de um reator com bagaço de cana-de-açúcar, e de inoculum ativo, tal como obtido na etapa precedente e resíduo de destilaria; e

15 - a alimentação em contínuo desse reator cheio segundo a etapa precedente, com vapores de etanol, permitindo o consumo desses vapores de etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de bagaço enriquecimento com proteínas de lêvedo.

20 8. Processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo, de acordo com a reivindicação 7, compreendendo as seguintes etapas:

- o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com melaço de cana-de-açúcar;

- o enchimento de um reator com bagaço de cana-de-açúcar, de inoculum ativo, tal como obtido na etapa precedente, colocado em cultura com resíduo de destilaria; e

5 - a alimentação em contínuo desse reator cheio segundo a etapa precedente, com vapores de etanol, permitindo o consumo desses vapores de etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de bagaço enriquecimento com proteínas de lêvedo.

9. Processo de enriquecimento de bagaço em proteínas de lêvedo, de acordo com a reivindicação 7, 10 compreendendo as seguintes etapas:

- o preparo de um inoculum ativo por incubação de pelo menos uma cepa de lêvedo forrageira, notadamente *Candida utilis*, com melaço de cana-de-açúcar;

15 - a mistura do inoculum ativo tal como obtido na etapa precedente e do bagaço de cana-de-açúcar e

- a alimentação em contínuo desse reator cheio segundo a etapa precedente, com vapores de etanol, permitindo o consumo desses vapores de etanol pelo lêvedo mencionado e a produção de bagaço enriquecimento com proteínas de lêvedo.

20 10. Processo, de acordo com uma das reivindicações 4 a 9, caracterizado pelo fato de o bagaço de cana-de-açúcar ser o bagaço fresco moído, cujas partículas têm um diâmetro compreendido de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mm, e, de preferência, compreendido de 25 aproximadamente 0,54 mm a aproximadamente 3 mm.

11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 10, caracterizado pelo fato de o melaço de cana-de-açúcar utilizado na etapa de preparo do inoculum ser completado em nitrogênio, e notadamente por sulfato de amônio e fosfato de amônio.

12. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 11, caracterizado pelo fato de a cepa de lêvedo ser incubada em presença de aproximadamente 22 a aproximadamente 82 g.L⁻¹, e de preferência aproximadamente 52 g.L⁻¹, de melaço, de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 g.L⁻¹, e, de preferência, aproximadamente 5,5 g.L⁻¹, de sulfato de amônio, e de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 g.L⁻¹, e, de preferência, aproximadamente 1,2 g.L⁻¹, de fosfato de amônio.

13. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 12, caracterizado pelo fato de a etapa de incubação da cepa de lêvedo com o melaço de cana-de-açúcar ser feita a uma temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 35°C e, de preferência, igual a aproximadamente 30°C, durante um período que varia de aproximadamente 15 horas a aproximadamente 22 horas, e, de preferência, durante um período de aproximadamente 18 horas.

14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 13, caracterizado pelo fato de o resíduo de destilaria ser previamente enriquecido em sais de nitrogênio, em sais de fósforo e em sais de magnésio, esse resíduo de destilaria sendo, de preferência, previamente enriquecido em sulfato de

amônio à razão de aproximadamente 73 g.L^{-1} , em fosfato de amônio à razão de aproximadamente 22 g.L^{-1} , e em sulfato de magnésio à razão de aproximadamente 7 g.L^{-1} .

5 15. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 14, caracterizado pelo fato de a cepa de lêvedo ser adicionada em água, a fim de se obter uma taxa de umidade de aproximadamente 60 a aproximadamente 75% e, de preferência, aproximadamente 65% em relação ao peso total do bagaço úmido.

10 16. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 15, caracterizado pelo fato de o reator ser alimentado pelo etanol à razão de aproximadamente $100 \text{ g.h}^{-1}.\text{m}^{-3}$ de reator a aproximadamente $20 \text{ g.h}^{-1}.\text{m}^{-3}$ de reator, e, de preferência, à razão de aproximadamente 150 a aproximadamente $200 \text{ g.h}^{-1}.\text{m}^{-3}$ de reator.

15 17. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 16, caracterizado pelo fato de a etapa de alimentação do reator em etanol ser feita em contínuo notadamente durante aproximadamente 7 dias à temperatura ambiente.

20 18. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 17, caracterizado pelo fato de o reator poder ser alimentado em etanol em fluxo descendente e/ou um fluxo ascendente.

25 19. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 18, caracterizado pelo fato de a parte superior do reator ser aspergida por uma solução de resíduo de destilaria

completada em nitrogênio e em fósforo, tal como definida na reivindicação 14.

20. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 19, caracterizado pelo fato de a água ser acrescentada pontualmente no decorrer do processo, notadamente em uma quantidade compreendida de 50 ml a 200 ml por litro de reator e por dia.

21. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 20, caracterizado pelo fato de compreender uma etapa final suplementar, consistindo em secar com ar seco o produto final correspondente ao bagaço enriquecido em proteínas de lêvedo e em recuperar o produto assim secado.

22. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 21, caracterizado pelo fato de o bagaço enriquecido em proteínas de lêvedo apresentar uma taxa em proteínas de aproximadamente 5 a aproximadamente 17 %, e, de preferência, de aproximadamente 17 % em relação ao peso total de bagaço seco.

23. Produto, tal como obtido segundo o processo, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 4 a 22.

RESUMO

Patente de Invenção “**PROCESSO DE ENRIQUECIMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS EM PROTEÍNAS DE LÊVEDO**”.

5 Trata-se de da utilização de melação de cana-de-açúcar e de resíduo de destilaria, para a aplicação de um processo de enriquecimento de resíduo lignocelulósico, notadamente de bagaço ou de palha, em proteínas de lêvedo. A presente invenção se refere também a esse processo de enriquecimento de resíduo
10 lignocelulósico, assim como o produto tal como obtido.