



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112016012273-9 B1**



**(22) Data do Depósito: 11/12/2014**

**(45) Data de Concessão: 17/05/2022**

---

**(54) Título:** MÉTODO DE PROCESSAMENTO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO AO USAR UM COMPOSTO CATIONICO

**(51) Int.Cl.:** C12P 19/02; C12P 19/14; C12P 7/64; C08B 1/00; C08B 1/08.

**(30) Prioridade Unionista:** 11/12/2013 EP 13196742.4.

**(73) Titular(es):** NESTE OYJ.

**(72) Inventor(es):** HEIDI VAINIO; OLAVI MYLLYMÄKI; VILLE PIHLAJANIEMI; MIKA SIPPONEN; SIMO LAAKSO; ILKKA LEHTOMÄKI; OSSI PASTINEN; PERTTU KOSKINEN.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2014077465 de 11/12/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/086783 de 18/06/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 30/05/2016

**(57) Resumo:** MÉTODO DE PROCESSAMENTO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO AO USAR UM COMPOSTO CATIONICO. A presente invenção refere-se a um método para a obtenção de frações de açúcar e lignina a partir de materiais lignocelulósicos e a um método para a produção de ao usar os açúcares obtidos a partir de lignocelulose. Em particular, a invenção refere-se a um método para aumentar o rendimento de açúcar no hidrolisado enzimático mediante a introdução de uma etapa de pré-tratamento de hidrólise hidrotérmica com uma etapa de deslignificação usando um composto cationico.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO DE PROCESSAMENTO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO AO USAR UM COMPOSTO CATIÔNICO**".

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a um método para a obtenção de frações de açúcar e lignina a partir de materiais lignocelulósicos e a um método para a produção de ao usar os açúcares obtidos a partir de lignocelulose. O método também se refere à reciclagem de uma corrente líquida alcalina obtida a partir do tratamento de deslignificação do material lignocelulósico.

Antecedentes da Invenção

[002] A lignocelulose é o biopolímero mais abundante na terra. A lignocelulose é o componente estrutural principal de plantas lenhosas e de plantas não lenhosas tais como a grama. A biomassa lignocelulósica refere-se à biomassa de planta que é composta de celulose, hemicelulose e lignina. Grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são produzidas através das indústrias de silvicultura, madeira e polpa e papel e de práticas agrícolas (por exemplo, palha, forragem, bagaço de cana de açúcar, debulho, cascas) e muitas agroindústrias. Também os dejetos municipais contêm frações que podem ser consideradas como resíduos de lignocelulose, tais como resíduos de papel ou papelão, resíduos de jardim ou resíduos de madeira de construção. Os resíduos lignocelulósicos, tais como resíduos agrícolas, oferecem a produção que não de alimentos e não-ILUC (mudança de uso indireto da terra) para a produção de biocombustíveis. Além disso, devido à grande abundância e ao preço baixo, os resíduos lignocelulósicos são os materiais preferidos para a produção dos biocombustíveis. Além disso, as plantações lenhosas ou herbáceas para a produção de energia dedicada com produtividade de biomassa ganharam interesse como o uso de biocombustível.

[003] A produção de biocombustíveis, especialmente do etanol, a partir de materiais lignocelulósicos por meio de fermentações microbianas tem sido estudada extensivamente. O maior desafio para a utilização de lignocelulósicos para a produção microbiológica de biocombustíveis ou de materiais de partida de biocombustíveis reside na complexidade do material de lignocelulose e sua resistência à biodegradação. Na lignocelulose, as fibras de celulose (20 a 50% em peso seco da planta) são embutidas na matriz covalentemente ligada de hemicelulose (20 a 40%), pectina (2 a 20%) e lignina (10 a 25%), formando uma estrutura muito resistente para a biodegradação.

[004] Além disso, os resíduos do açúcar de hemicelulose contêm uma mistura variada de hexoses (por exemplo, glicose, manose e galactose), e pentoses (por exemplo, arabinose e xilose) dependendo da biomassa.

[005] Determinados micro-organismos podem produzir lipídeos a partir de moléculas orgânicas, tais como os açúcares derivados da lignocelulose. Determinados micro-organismos, tipicamente a levedura, fungos ou bactérias, podem converter eficientemente os açúcares C6 e C5 nos materiais lignocelulósicos em óleo. O óleo produzido por micro-organismos heterotróficos é frequentemente chamado óleo de uma só célula ou óleo microbiano. O processo de produção do óleo de uma só célula ao usar micro-organismos heterotróficos compreende o cultivo de micro-organismos em biorreatores ventilados, permitindo que as células acumulem lipídeos, colhendo as células ricas em lipídeos e recuperando o óleo das células. Os lipídeos à base de micro-organismos (isto é, os óleos de uma só célula) podem ser usados como materiais brutos para a produção de biocombustíveis tais como o biodiesel, o diesel renovável e o biocombustível de jato.

[006] A produção economicamente praticável de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos por meio da fermentação microbi-

ana requer uma conversão eficiente de todos os constituintes de carboidratos principais dos materiais lignocelulósicos em biocombustíveis. Por outro lado, a praticabilidade econômica da produção de biocombustível requer que todos os constituintes de carboidratos principais do material lignocelulósico tenham que ser convertidos em açúcares, que são apropriados para a fermentação microbiana. Normalmente isso significa quebrar (hidrolisar) as estruturas poliméricas de frações de hemicelulose e de celulose para obter açúcares monoméricos.

[007] A técnica anterior descreve vários métodos, cujo objetivo é a produção de açúcares a partir de materiais lignocelulósicos e o uso de açúcares em um processo de fermentação microbiana.

[008] A publicação de patente W02010039783A1 descreve um método para a produção de açúcares fermentáveis a partir de materiais lignocelulósicos, em cujo método a lignina dissolvida durante o tratamento com álcali é adsorvida em um polímero de amido catiônico antes de conduzir a fração celulósica para um tratamento de hidrólise enzimática. A publicação não inclui a separação do líquido da deslignificação alcalino depois do tratamento de deslignificação antes da hidrólise enzimática para recuperar a lignina do líquido de deslignificação, e para reciclar a corrente de líquido de volta ao tratamento de deslignificação após a recuperação da lignina com o composto catiônico sem o a mudança no pH. No método conhecido, a lignina adsorvida não é removida da fração celulósica antes do tratamento de hidrólise enzimática. De acordo com os ensinamentos do documento de patente W02010039783A1, a adsorção de lignina realça o tratamento de hidrólise enzimática.

[009] A publicação de patente IN217148B descreve um método para a separação de lignina do licor preto de um processo de fabricação de polpa com uma combinação de um floculante tal como um polímero e um coagulante de amido catiônico tal como ácido mineral com

uma mudança no pH até menos de um pH 6.

[0010] Um dos desafios principais na produção de açúcares lignocelulósicos a partir de material lignocelulósico consiste na provisão de um processo que permite a produção econômica de hidrolisados de açúcar de alta qualidade, que podem ser usados em uma produção subsequente da etapa de fermentação. A alta qualidade dos hidrolisados de açúcar significa que a quantidade de impurezas tais como fenóis e ácidos deve estar abaixo da concentração, a qual é tóxica ao micro-organismo usado na fermentação. A economia requer que o consumo dos produtos químicos usados na produção dos hidrolisados deva ser mantida a um nível baixo. Isso pode ser conseguido, por exemplo, mediante a reciclagem de produtos químicos de cozimento. A praticabilidade econômica também requer que a qualidade das correntes laterais, que não são usadas como matéria prima para a fermentação microbiana, deva ser tão elevada quanto possível para permitir a valorização dessas correntes.

[0011] As tecnologias de pré-tratamento de lignocelulose do estado da técnica foram projetadas para fermentações anaeróbicas (etanol celulósico). A produção de óleo microbiano difere das fermentações anaeróbicas, uma vez que é um processo aeróbico (requer o oxigênio). A presente invenção descreve um processo de fracionamento de lignocelulose que tem benefícios especialmente para bioprocessos aeróbicos, tal como a produção de óleo microbiano. A presente invenção, no entanto, também é aplicável aos bioprocessos anaeróbicos.

#### Sumário da Invenção

[0012] O objetivo da presente invenção consiste na provisão de um processo de fracionamento de lignocelulose, que resolva os problemas dos processos da técnica anterior que estão relacionados a um baixo rendimento total de açúcar do material lignocelulósico e custos químicos elevados da colheita dos produtos que não carboidratos.

[0013] Um outro objetivo da presente invenção consiste na provisão de um método que permita a produção de hidrolisados de açúcar a ser usados na produção de óleo microbiano com micro-organismos heterotróficos.

[0014] Ainda um outro objetivo da presente invenção consiste na provisão de um processo de fracionamento com rendimento e produtividade melhorados do tratamento de hidrólise enzimática.

[0015] Ainda um outro objetivo da presente invenção consiste na provisão de um processo mais econômico e versátil para a recuperação e o valorização de frações que não de carboidratos de lignocelulose.

[0016] Para atingir os objetivos acima mencionados, a invenção é caracterizada pelas características definidas nas reivindicações independentes. Outras realizações preferidas são apresentadas nas reivindicações dependentes.

[0017] A invenção é baseada na constatação de que a lignina dissolvida no tratamento com álcali pode ser eficientemente precipitada com um composto catiônico e que, depois da separação do material precipitado, o licor alcalino pode ser reciclado de para a etapa de designificação alcalina. A reciclagem do licor alcalino melhora de maneira significativa a economia da etapa de tratamento alcalino.

[0018] De acordo com a invenção, a lignina é precipitada a um pH alcalino usando um composto catiônico. Além disso, a precipitação da lignina com um composto catiônico e a separação do material precipitado do licor alcalino pode ser conduzida a um pH alcalino sem a necessidade de mudar o pH. Isso permite uma reciclagem eficiente do agente alcalino na etapa de tratamento alcalino do método de fracionamento de lignocelulose. Uma vez que o pH não é alterado durante a recuperação da lignina, a quantidade de agente alcalino (fresco) da composição para o tratamento alcalino é menor em comparação a um

caso em que o pH tem que ser reduzido por compostos ácidos para a recuperação de lignina.

[0019] A invenção também é baseada na constatação surpreendente que, com a separação da lignina antes da etapa de hidrólise enzimática pelo tratamento com álcali, a eficiência da hidrólise enzimática das frações celulósicas e a economia da fermentação aeróbica são melhoradas de maneira significativa. O cultivo aeróbica econômica é melhorada devido à pequena quantidade de material inerte (lignina) e de compostos inibidores na fração de açúcar usada na fermentação aeróbica.

[0020] Por conseguinte, um aspecto da presente invenção refere-se a um método para o fracionamento de um material lignocelulósico, em que o método compreende

a) a sujeição do material lignocelulósico a um tratamento de deslignificação na presença de um agente de deslignificação alcalina para produzir uma mistura que compreende uma primeira fase sólida e uma primeira fase líquida que contém lignina dissolvido,

b) a separação da primeira fase sólida da primeira fase líquida,

c) a introdução de um composto catiônico na primeira fase líquida para produzir uma mistura que compreende uma segunda fase sólida e uma segunda fase líquida,

d) a sujeição da primeira fase sólida a um tratamento de hidrólise enzimática na presença de enzimas que podem hidrolisar as frações de hemicelulose e celulose da primeira fase sólida para produzir uma mistura que compreende uma terceira fase líquida e uma terceira fase sólida,

e) a separação da terceira fase líquida da terceira fase sólida.

[0021] Um segundo aspecto da presente invenção refere-se a uma

fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático que pode ser obtido pelo método da presente invenção. O hidrolisado enzimático pode ser opcionalmente concentrado.

[0022] Desse modo, um terceiro aspecto da presente invenção refere-se a um hidrolisado concentrado de açúcar que pode ser obtido pelo método de acordo com o método da presente invenção.

[0023] Um aspecto adicional refere-se a um método para a produção de lipídeo microbiano, em que o método compreende

(i) a provisão de um meio de cultivo que compreende uma terceira fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático ou um hidrolisado de açúcar concentrado de acordo com a presente invenção,

(ii) a provisão de um caldo de fermentação por meio da inoculação do meio do cultivo com um micróbio oleaginoso,

(iii) a incubação do dito meio inoculado com o dito micróbio oleaginoso, permitindo que o lipídeo acumule,

(iv) a recuperação do lipídeo do dito micróbio oleaginoso.

#### Breve Descrição dos Desenhos

[0024] As Figuras 1 a 3 esboçam esquemas do processo para o tratamento de material lignocelulósico correspondente.

[0025] A Figura 4 esboça o processo para a hidrólise enzimática de acordo com as realizações da invenção.

[0026] A Figura 5 apresenta o efeito da dosagem de amido catiônico na diminuição da porcentagem na absorbância a 280 nm e a 600 nm depois de uma incubação de 4 horas da solução de deslignificação de NaOH do Exemplo 5 à temperatura ambiente.

[0027] A Figura 6 apresenta o efeito da dosagem de amido catiônico na diminuição da porcentagem na absorbância a 280 nm e a 600 nm depois de uma incubação de 4 horas da solução de deslignificação de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à temperatura ambiente.

[0028] A Figura 7 apresenta uma fotografia dos tubos de ensaio

que contêm a solução de deslignificação de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  8 horas depois da suplementação de amido catiônico "Raifix 25035". A dosagem de amido catiônico para a matéria seca das soluções de deslignificação era, da esquerda para a direita, de 0,074 g/g, 0,147 g/g, 0,214 g/g, 0,267 g/g e 0,332 g/g.

[0029] A Figura 8 apresenta o efeito da dosagem de amido catiônico "Raifix 25035" na diminuição na absorbância a 280 nm.

[0030] A Figura 9 mostra uma fotografia dos tubos de ensaio que contêm o líquido não alcalino 24 h depois da suplementação de amido catiônico "Raifix 25035". A dosagem de amido catiônico para a matéria seca do líquido não alcalino era, da esquerda para a direita, de 13 mg/g, 28 mg/g, 41 mg/g e 68 mg/g.

[0031] A Figura 10 apresenta os rendimentos totais da palha deslignificada com NaOH e da palha auto-hidrolisada na hidrólise descontínua depois de 24 horas, 48 horas e 72 horas, após a 1<sup>a</sup>, a 2<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> hidrólises sequenciais e após a reciclagem dos sólidos e uma reação de 24 horas adicionais.

[0032] A Figura 11 apresenta produtividades de enzima na hidrólise da palha deslignificada com NaOH e da palha auto-hidrolisada na hidrólise descontínua, na hidrólise sequencial e na reciclagem de sólidos.

[0033] A Figura 12 apresenta as produtividades de açúcar volumétricas da palha deslignificada com NaOH e da palha auto-hidrolisada na hidrólise descontínua, na hidrólise sequencial e na reciclagem de sólidos. O processo de 48 horas compreende uma hidrólise descontínua de 48 horas ou duas reações de hidrólise sequenciais de 24 horas, ou uma reação de 24 horas de reciclagem de sólidos em estado estável com uma taxa de reciclagem de 50%. O processo de 72 horas compreende uma hidrólise descontínua de 72 horas ou três hidrólises sequenciais de 24 horas ou a reação de reciclagem e uma hidrólise de

24 horas adicionais.

[0034] A Figura 13 apresenta a progressão (rendimento de açúcar, volume da reação e consistência da reação) de reações de reciclagem de sólidos consecutivas na hidrólise enzimática da de palha deslignificada com NaOH e de palha auto-hidrolisada com uma taxa de reciclagem de 50% em termos da hidrólise (a), do volume da reação (B) e da consistência da reação (c).

[0035] A Figura 14 apresenta o desempenho (peso seco da célula (CDW) (g/l), a concentração de ácido graxo (FA) (g/l), o peso seco da célula livre de gordura (VACA) (g/l) e o teor de ácido graxo (FA) (%) na biomassa microbiana) da fermentação descontínua carregada com *Aspergillus oryzae* em hidrolisados de celulose e de hemicelulose da palha de trigo.

[0036] A Figura 15 apresenta o rendimento do resíduo sólido da auto-hidrólise da palha de trigo.

[0037] A Figura 16 apresenta a concentração de açúcar solúvel total (g/l, eixo y à esquerda) e de substâncias inibidoras microbianas potenciais; furfural, hidróxi metil furural (HMF) e compostos fenólicos solúveis (g/l, eixo y à direita) na fração líquida obtida a partir da auto-hidrólise da palha de trigo a uma consistência de 10% (g de matéria seca de sólidos da palha/g do total).

[0038] Tabela 1. Comparação do rendimento da matéria seca (rendimento de DM) da palha auto-hidrolisada com tratamentos de deslignificação diferentes. O rendimento de açúcar da hidrólise enzimática da palha deslignificada era dependente das condições do tratamento. O rendimento do açúcar a seguir é fornecido com base na matéria seca da palha auto-hidrolisada e baseado no teor de carboidrato da palha auto-hidrolisada.

[0039] Tabela 2. Precipitação de lignina do sobrenadante alcalino por acetato de Ca e por tratamentos consecutivos, primeiramente com

amido catiônico e então com acetato de Ca.

[0040] Tabela 3. Precipitação de lignina do sobrenadante alcalino por acetato de Ca e por tratamentos consecutivos, primeiramente com amido catiônico e então com acetato de Ca.

[0041] Tabela 4. Composição do meio de crescimento antes das cargas.

#### Descrição Detalhada da Invenção

[0042] Na descrição das realizações da invenção, recorre-se a uma terminologia específica para fins de clareza. No entanto, a invenção não se presta a ficar limitada aos termos específicos selecionados dessa maneira, e deve ficar compreendido que cada termo específico inclui todos os equivalentes técnicos que operam de uma maneira similar para atingir uma finalidade similar.

#### Definições

##### **Material lignocelulósico**

[0043] Os termos "biomassa lignocelulósica" ou "material lignocelulósico" se prestam a incluir, mas sem ficarem a eles limitados, plantas lenhosas ou plantas não lenhosas, herbáceas ou outros materiais que contêm celulose e/ou hemicelulose: Os materiais podem ser resíduos agrícolas (tais como palha de trigo, palha de arroz, debulho, cascas, forragem de milho, bagaço de cana de açúcar, topos e folhas de cana de açúcar), plantações para gerar energia dedicadas (tais como capim switchgrass, *Miscantus*, *Arundo donax*, junco amarelo, salgueiro, jacinto da água, cana para gerar energia, sorgo para gerar energia), materiais ou resíduos (incluindo serragem e polpa e/ou resíduos ou frações de fábrica de papel, tais como hemicelulose, licor de sulfito usado, fibras residuais e/ou lama primária), musgo ou turfa, ou papel residual municipal. O termo material lignocelulósico também compreende os materiais com baixo teor de lignina, materiais tais como a biomassa de macroalgas. Além disso, os materiais também compreen-

dem frações de hemicelulose ou de celulose de práticas industriais. O termo material lignocelulósico engloba qualquer tipo de fração de celulose. Os materiais brutos ou determinadas frações, tais como de hemicelulose e/ou celulose, de materiais brutos de origens diferentes, espécies de plantas, ou processos industriais podem ser misturados entre si e usados como materiais brutos para o cultivo da biomassa de micro-organismos de acordo com a presente invenção. Tipicamente, o teor de lignina na lignocelulose é maior do que 5%. A biomassa lignocelulósica pode também conter amido, por exemplo, no caso de plantas inteiras.

### **Hidrólise**

[0044] O termo "hidrólise" refere-se aqui à despolimerização pela adição de água a ligações glicosídicas ou a ligações éster de carboidratos não monoméricos a oligômeros e monômeros de açúcar ou ácidos carboxílicos.

### **Hidrolisado**

[0045] Os termos "hidrolisado" ou "material hidrolisado" referem-se aqui ao material que foi submetido à hidrólise.

### **Gravidade**

[0046] O termo "gravidade" refere-se aqui ao fator, que é calculado pela equação 1 e que descreve as condições hidrotérmicas em termos da temperatura e do tempo de reação.

$$S = \text{Log}(R_0),$$

onde  $R_0 = \int_0^t \exp((T(t) - T_r)/14,7) dt$ , e  $T_r$  é a temperatura base (100°C).

### **Hidrolisado de Lignocelulose**

[0047] O termo "hidrolisado de lignocelulose" refere-se aqui aos produtos da hidrólise de lignocelulose ou de material lignocelulósico que compreendem a celulose e/ou a hemicelulose, oligossacarídeos, mono- e/ou dissacarídeos, ácido acético, ácido fórmico, outros ácidos

orgânicos, furfural, hidróxi metil furfural, ácido levulínico, compostos fenólicos, outros produtos da hidrólise e/ou da degradação formados a partir de lignina, celulose, hemicelulose e/ou outros componentes de lignocelulose, compostos de nitrogênio derivados de proteínas, metais e/ou fragmentos não hidrolisados ou parcialmente hidrolisados de lignocelulose.

### **Tratamento hidrotérmico**

[0048] No contexto da presente invenção, o termo "tratamento hidrotérmico" refere-se ao tratamento a quente da suspensão de lignocelulose aquosa a temperaturas que excedem 50°C. O tratamento hidrotérmico pode ser realizado sob pressão em um reator pressurizado ou à pressão atmosférica em um reator não pressurizado. A pressão no reator pressurizado pode ser gerada pelo vapor obtido da água quando aquecida até o ponto de ebulição ou pela fase de gás pressurizado adicionada. O tratamento hidrotérmico pode ser realizado na presença de um catalisador ou na ausência de um catalisador. O tratamento hidrotérmico na ausência de um catalisador (também conhecido como "auto-hidrólise" ou "AH") para a hidrólise de biomassa lignocelulósica sem catalisador adicionado quando a suspensão aquosa de biomassa lignocelulósica é sujeitada ao tratamento hidrotérmico a temperaturas que excedem 120°C sob pressão.

[0049] "Palha auto-hidrolisada" refere-se aqui à fração de sólido que foi obtida após a auto-hidrólise. A palha auto-hidrolisada pode ter sido sujeitada à lavagem.

### **Tratamento de deslignificação**

[0050] "Tratamento de deslignificação" refere-se aqui a um tratamento que remove o material de não de carboidrato tal como lignina da biomassa lignocelulósica. O tratamento de deslignificação também se refere a um tratamento que remove material tanto que de não carboidrato e carboidrato como uma mistura da biomassa lignocelulósica.

**Explosão de vapor**

[0051] No contexto da presente invenção, o termo "explosão de vapor" refere-se a um tratamento, em que o material é aquecido por um vapor a alta pressão (a temperaturas entre 110°C e 250°C, tipicamente de 140 a 230°C) sob uma pressão com ou sem a adição de produtos químicos (tais como ácidos) e o material é mantido a essa temperatura por algum tempo depois do qual a pressão é liberada, causando uma despressurização explosiva do material. Neste contexto, a explosão de vapor é aplicada aos materiais lignocelulósicos, e resulta tipicamente em uma ruptura da estrutura rígida das fibras de lignocelulose, isto é, a desfibrilação dos feixes de fibras de celulose.

**Agente de deslignificação alcalina**

[0052] No contexto da presente invenção, o termo "agente de deslignificação alcalina" refere-se a um composto químico ou a uma mistura de compostos químicos que, quando adicionado à água, resulta em soluções com uma atividade de íons de hidrogênio mais baixa do que aquela da água pura, isto é, um pH mais alto do que 7,0. O agente de deslignificação alcalina pode ser selecionado de um grupo de compostos que compreendem, mas sem ficarem a eles limitados, hidróxidos tais como LiOH (hidróxido de lítio), NaOH (hidróxido de sódio), KOH (hidróxido de potássio), Ca(OH)<sub>2</sub> (hidróxido de cálcio), NH<sub>4</sub>OH (hidróxido de amônio), ou compostos que podem formar íons hidróxido na água, tais como NH<sub>3</sub> (amônia) no estado líquido ou gasoso, carbonatos tais como HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (íon bicarbonato), Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonato de lítio), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonato de sódio), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonato de potássio), sulfetos tais como Na<sub>2</sub>S (sulfeto de sódio), e os hidratos correspondentes

**Tratamento de deslignificação alcalina**

[0053] No contexto da presente invenção, o termo tratamento de deslignificação alcalina refere-se ao "tratamento de lignocelulose executado na presença do agente de deslignificação alcalina, a um pH

(pH inicial) tipicamente entre 10 e 13. No tratamento de deslignificação alcalina, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pode ser usado em combinação com o agente de deslignificação alcalina.

### **Composto catiônico**

[0054] O termo "composto catiônico" refere-se a um ou a mais compostos que compreendem íons catiônicos ou misturas dos mesmos que compreendem íons catiônicos. Os compostos catiônicos incluem, mas sem ficar a eles limitados, compostos que compreendem um grupo catiônico tal como amônio quaternário. Os compostos catiônicos que compreendem amônio quaternário incluem, mas sem ficar a eles limitados, polímeros e oligômeros catiônicos, tais como amido catiônico, amilose catiônica, amilopectina catiônica, dextrana catiônica, oligômeros de lignina catiônicos, polímeros de lignina catiônicos, turfa catiônica, ou as misturas destes. Os polímeros e os oligômeros catiônicos preferidos têm uma densidade de carga catiônica de 0,5 a 5 meq/g. Os compostos catiônicos também incluem compostos que podem formar íons catiônicos divalentes ou multivalentes tais como íons  $Ca_2^+$  ou  $Mg_2^+$  na água. Esses compostos que podem formar íons catiônicos divalentes ou multivalentes incluem, mas sem ficar a eles limitados, acetatos, bicarbonatos, brometos, cloretos, formatos, hidróxidos e nitratos de íons catiônicos multivalentes. Em uma modalidade preferida da presente invenção, o método de fracionamento usa um amido ou um cloreto de alumínio catiônico.

### **Composto oligomérico**

[0055] Oligômero e composto oligomérico referem-se a um composto que consiste em menos de 15 unidades monoméricas ligadas idênticas ou não idênticas.

### **Hidrólise enzimática**

[0056] No contexto da presente invenção o termo "hidrólise enzimática" refere-se ao tratamento enzimático do material lignocelulósico

que compreende celulose e/ou hemicelulose, oligossacarídeos, onde as enzimas facilitam a hidrólise da celulose e/ou da hemicelulose, oligossacarídeos para obter mono- e/ou dissacarídeos. O tratamento de hidrólise enzimática do material lignocelulósico é tipicamente realizado ao sujeitar o material lignocelulósico a uma mistura de enzimas na presença da água ou de um tampão. A mistura de enzimas consiste tipicamente, mas sem ficarem a elas limitada, 1,4- $\beta$ -glucanases (endoglucanases e exoglucanases, ou endocelulases e exocelulases), 1,4- $\beta$ -glucosidases (celobiasas) e enzimas de degradação de hemicelulose (hemicelulases, xilanases, arabinases, etc.).

#### **Lipídeo ou lipídeo microbiano**

[0057] No contexto da presente invenção, "lipídeo microbiano", "lipídeo" ou "lipídeo intracelular" refere-se a uma substância graxa, cuja molécula contém geralmente, como parte, uma cadeia de hidrocarboneto alifático, que se dissolve em solventes orgânicos não polares mas é pouco solúvel na água. Os lipídeos são um grupo essencial de moléculas grandes em células vivas. Os lipídeos são, por exemplo, gorduras, óleos, ceras, ésteres de ceras, esteróis, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, poliídrixi alcanoatos, ácidos nucleicos, ácidos graxos, álcoois graxos, aldeídos graxos, ésteres de ácidos graxos, fosfolipídeos, glicolipídeos, esfingolipídeos e acilgliceróis, tais como triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis. Os lipídeos preferidos na presente invenção são gorduras, óleos, ceras, acilgliceróis e ácidos graxos e seus derivados, em particular triacilgliceróis e ésteres de ceras. No contexto da presente invenção os lipídeos são sintetizados por e acumulados nos micróbios (lipídeos intracelulares). Em uma outra modalidade da invenção, os lipídeos são sintetizados por e excretados por micróbios (lipídeos extracelulares).

[0058] Em conexão com a presente invenção, um óleo de uma só célula é usado como sinônimo para lipídeos e gorduras.

[0059] O termo "acil glicerol" refere-se a um éster de glicerol e de ácidos graxos. Os acil gliceróis ocorrem naturalmente como gorduras e óleos graxos. Os exemplos de acil gliceróis incluem triacil gliceróis (TAGs, triglicerídeos), diacil gliceróis (diglicerídeos) e monoacil gliceróis (monoglicerídeos).

### **Açúcar**

[0060] No contexto da presente invenção, o termo "açúcar" refere-se aqui a carboidratos oligoméricos, diméricos e monoméricos. Em particular, neste pedido de patente, o termo açúcar refere-se aos carboidratos oligoméricos, diméricos e monoméricos solúveis em água derivados de materiais lignocelulósicos. O termo "açúcares poliméricos" refere-se os carboidratos que estão na forma polimérica e não são tipicamente solúveis na água.

### **Rendimento de açúcar**

[0061] No contexto da presente invenção, o termo "rendimento de açúcar" refere-se aqui ao rendimento de carboidratos oligoméricos, diméricos e monomérico de materiais particulares. Em particular, neste pedido de patente o termo rendimento de açúcar refere-se ao rendimento de carboidratos oligoméricos, diméricos e monomérico solúveis em água derivados de materiais lignocelulósicos.

### **Processo de produção de óleo de uma só célula**

[0062] "Processo de produção de óleo de uma só célula" refere-se aqui a um processo que compreende as etapas de formação ou que permite o crescimento de um micro-organismo sintetizador de lipídeo e que permite que a massa do organismo obtida desse modo produza e/ou armazene (acumule) o lipídeo, recuperando as células da fase líquida, e extraindo ou recuperando os lipídeos das células. Em determinados casos, o óleo de uma só célula também pode ser extracelular, tal como excretado ou liberado das células no meio de cultura durante ou após o cultivo.

**Cultivo aeróbico**

[0063] O termo "cultivo aeróbico" ou "fermentação aeróbica" refere-se ao cultivo em que o micro-organismo utiliza o oxigênio como aceptor de elétron terminal para a geração da energia (isto é, o micro-organismo usa a respiração aeróbica). Tipicamente, nos biorreatores, o cultivo aeróbico é executado ao adicionar o oxigênio ou uma mistura de gás que contém oxigênio (tipicamente o ar), isto é, o biorreator é aerado. Quando os micro-organismos usam a respiração aeróbica no cultivo, ele pode ser indicado como "cultivo sob condições aeróbicas". Tipicamente, isso ocorre em biorreatores aerados.

**Processo de produção de óleo de uma só célula**

[0064] "Processo de produção de óleo de uma só célula" refere-se aqui a um processo que compreende as etapas de formação ou que permite a formação de um micro-organismo sintetizador de lipídeo e que permite que a massa do organismo obtida desse modo produza e/ou armazene (acumule) o lipídeo, recuperando as células da fase líquida, e extraindo ou recuperando os lipídeos das células. Em determinados casos, o óleo de uma só célula também pode ser extracelular, como excretado ou liberado das células no meio de cultura durante ou após o cultivo.

**Micróbio oleaginoso micro-organismo produtor de óleo**

[0065] O micróbio oleaginoso (também indicado como organismo produtor de óleo) usado na presente invenção é selecionado do grupo de bactérias, cianobactéria, fungos tais como leveduras e fungos filamentosos, archaea ou microalgae. Os micro-organismos podem acumular de imediato lipídeos ou ter sido geneticamente modificados para acumular lipídeos ou para melhorar a acumulação de lipídeos.

[0066] Os organismos que podem utilizar açúcares C6 e C5 são de preferência usados. De preferência, os organismos são leveduras, fungos filamentosos ou bactérias.

[0067] No contexto da presente invenção, o micro-organismo oleaginoso (micróbio oleaginoso) refere-se a um micro-organismo que pode acumular lipídeos intercelulares de maneira tal que os lipídeos somam pelo menos 15% (em peso/peso) da biomassa total (por peso seco da célula) do micróbio quando ele é cultivado sob condições apropriadas. Em uma modalidade preferida, o micróbio oleaginoso é capaz de acumular pelo menos 20% (em peso/peso) da biomassa total do micróbio (por peso seco da célula).

[0068] As cepas de micro-organismos preferidas para as finalidades da presente invenção incluem, mas sem ficar a eles limitadas, as espécies e os gêneros listados a seguir:

[0069] De acordo com uma modalidade da invenção, o micróbio é um micróbio oleaginoso que pode utilizar os açúcares derivados de materiais lignocelulósicos. De preferência, os organismos oleaginosos podem utilizar açúcares C6 (açúcares com seis carbonos, tais como a glicose, a manose e a galactose) e C5 (tais como a xilose e a arabinose) em hidrolisados lignocelulósicos. De acordo com uma modalidade da invenção, o organismo oleaginoso pode utilizar carboidratos poliméricos ou oligoméricos na lignocelulose ou em frações da mesma.

[0070] As cepas de fungos (filamentosos) preferidas são das espécies dos gêneros *Aspergillus* tal como *Aspergillus oryzae*, *Mortierella* tal como *Mortierella isabellina*, *Chaetomium*, *Claviceps*, *Cladosporidium*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Fusarium*, *Glomus*, *Mucor*, *Pseudozyma*, *Pythium*, *Rhizopus*, tal como *Rhizopus oryzae*, *Tremella*, *Zygorhynchus*, *Humicola*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Umbelopsis* tal como *Umbelopsis isabellina* e *Ustilago*. As espécies de fungos mais preferidas são dos gêneros *Aspergillus* e/ou *Mortierella*. Os fungos preferidos são os fungos com capacidade de produzir eficazmente lipídeos.

[0071] As cepas de leveduras preferidas são aquelas que pertencem

cem às espécies dos gêneros *Geotrichum*, *Deparyomyces*, *Pachyso-*  
*len*, *Galactomyces*, *Hansenula*, *Leucosporidium*, *Sporobolomyces*,  
*Sporidiobolus*, *Waltomyces*, *Criptomococcus*, tal como *Criptomococcus cur-*  
*vatus*, *Rhodosporeidum*, tal como *Rhodosporeidum toruloides* ou *Rho-*  
*dosporeidum fluviale*, *Rhodotorula*, tal como *Rhodotorula glutinis*, *Yar-*  
*rowia*, tal como *Yarrowia lipolytica*, *Candida* tal como *Candida curvata*,  
*Lipomyces* tal como *Lipomyces starkeii* e *Trichosporon* tal como *Tri-*  
*chosporon cutaneum* ou *Trichosporon pullulans*. A maior parte das le-  
veduras preferidas são dos gêneros *Lipomyces*, *Rhodosporeidum* e  
*Criptomococcus*. Os fermentos preferidos são os fermentos com capaci-  
dade de produzir lipídeos eficazmente.

[0072] As bactérias preferidas são aquelas que pertencem às es-  
pécies dos gêneros *Rhodococcus*, *Acinetobacter* e *Streptomyces*. As  
bactérias preferidas são as bactérias com capacidade de produzir lipí-  
deos eficazmente.

[0073] A maior parte das algas preferidas são microalgae, tais co-  
mo as espécies de microalgas dos gêneros que compreendem *Brachi-*  
*omonas*, *Cryptecodinium*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Hantzschia*, *Nan-*  
*nochloris*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Prototheca*, *Scenedesmus*,  
*Schizochytrium*, *Traustochytrium* e *Ulkenia*. As microalgae preferidas  
são as microalgas com capacidade de crescimento heterotrofical e de  
produzir lipídeos eficazmente. Os organismos que pertencem aos gê-  
neros *Schizochytrium*, *Traustochytrium* e *Cryptecodinium* e *Ulkenia* são  
chamados às vezes de fungos marinhos.

[0074] De acordo com uma outra modalidade da invenção, os car-  
boidratos de biomassa lignocelulósico estão principalmente na forma  
monomérica e os organismos que não podem utilizar carboidratos oli-  
gomérico ou poliméricos são usados para a produção de óleo de uma  
só célula. Tais organismos produtores de óleo são selecionados do  
grupo de bactérias, cianobactérias, fungos tais como leveduras e fun-

gos filamentosos, archaea ou microalgae. Os micro-organismos podem acumular lipídeos de imediato ou ter sido geneticamente modificados para acumular lipídeos ou para melhorar a acumulação dos lipídeos.

### **Recuperação de lipídeo**

[0075] "Recuperação de óleo" ou "recuperação de lipídeo" ou "recuperação de lipídeo de um micróbio oleaginoso" refere-se a um processo em que o lipídeo (lipídeo intracelular) é recuperado por métodos mecânicos, químicos, termomecânicos ou autocatalíticos ou por uma combinação desses métodos, das células dos micro-organismos. Alternativamente, "recuperação de óleo" pode significar a recuperação de lipídeos extracelularmente produzidos a partir de caldo de cultivo (fermentação).

### **Massa de uma só célula que contém lipídeo**

[0076] "Massa de uma só célula contendo lipídeo" refere-se a uma massa de uma só célula e um micélio celular com um teor de lipídeo pelo menos de preferência de pelo menos 10%, de preferência de pelo menos 15% (em peso/peso) ou mais de matéria seca da biomassa do micro-organismo.

### **Massa de célula residual**

[0077] No contexto da presente invenção, "massa de célula residual" refere-se a uma fração de material sólida, semi-sólida ou fluente, que contém os micro-organismos tratados para a recuperação de lipídeos intracelulares.

### **Biocombustível**

[0078] No contexto da presente invenção, "biocombustível" refere-se a combustível sólido, líquido ou gasoso derivado principalmente de biomassa ou de biorresíduo, e é diferente dos combustíveis fósseis, que são derivados de restos orgânicos de plantas e animais pré-históricos.

[0079] De acordo com a diretriz EU 2003/30/EU, "biodiesel" refere-se a um éster metílico produzido a partir de óleo vegetal ou de óleo animal de qualidade diesel a ser usado como biocombustível. Mais amplamente, biodiesel refere-se aos ésteres de alquila de cadeia longa, tais como ésteres de metila, etila ou propila, de óleo vegetal ou de óleo animal de qualidade diesel. O biodiesel também pode ser produzido a partir dos lipídeos de micro-organismos, por meio de que o lipídeo do micro-organismo pode originar de uma bactéria, um fungo (levedura ou um bolor), algas ou um outro micro-organismo.

### **Diesel renovável**

[0080] "Diesel renovável" refere-se a um combustível que é produzido por um tratamento com hidrogênio dos lipídeos de uma origem animal, vegetal ou de micro-organismo, ou as suas misturas, por meio do que o lipídeo do micro-organismo pode originar de uma bactéria, um fungo (levedura ou um fungo filamentoso), algas ou um outro micro-organismo. O diesel renovável também pode ser produzido a partir de ceras derivadas de biomassa por meio de gasificação e pela síntese de Fischer-Tropsch. Opcionalmente, além do tratamento com hidrogênio, a isomerização ou outras etapas de processamento podem ser executadas. O processo diesel renovável também pode ser usado para produzir o combustível de jato e/ou a gasolina. A produção de diesel renovável foi descrita nas publicações de patente EP 1396531, EP1398364, EP 1741767 e EP1741768.

[0081] O biodiesel ou o diesel renovável pode ser misturado com os combustíveis fósseis. Os aditivos apropriados, tais como conservantes e antioxidantes, podem ser adicionados ao produto de combustível.

### **Lubrificante**

[0082] "Lubrificante" refere-se a uma substância, tal como graxa, lipídeo ou óleo que reduz o atrito quando aplicada como um revesti-

mento de superfície a peças móveis. Outras duas funções principais de um lubrificante são a remoção de calor e para dissolver impurezas. As aplicações dos lubrificantes incluem, mas sem ficar a eles limitadas, usos nos motores de combustão interna como óleos de motor, aditivos em combustíveis, em dispositivos movidos a óleo tais como bombas e equipamentos hidráulicos, ou em tipos diferentes de rolamentos. Tipicamente, os lubrificantes contêm 75 a 100% de óleo base e o restante consiste em aditivos. Os aditivos apropriados são, por exemplo, detergentes, estabilizantes de armazenagem, antioxidantes, inibidores da corrosão, desembaçadores, desemulsificantes, agentes supressores de espuma, cossolventes e aditivos de lubricidade (vide, por exemplo, a patente U.S. 7.691.792). O óleo base para o lubrificante pode originar de óleo mineral, óleo vegetal, óleo animal ou de uma bactéria, fungos (levedura ou um fungo filamentoso), algas ou um outro micro-organismo. O óleo base também pode originar de ceras derivadas de biomassa por meio de gasificação e da síntese de Fischer-Tropsch. O índice de viscosidade é usado para caracterizar o óleo base. Um índice tipicamente elevado da viscosidade é o preferido.

[0083] Os lipídeos produzidos de acordo com o método descrito na presente invenção podem ser usados como material de partida para a produção de biodiesel, diesel renovável, combustível de jato ou gasolina. O biodiesel consiste em ésteres metílicos de ácidos graxos, e é produzido tipicamente por meio de transesterificação. Na transesterificação, os acil gliceróis são convertidos em ésteres de alquila de cadeia longa (metila, etila ou propila) de ácidos graxos. O diesel renovável refere-se ao combustível que é produzido pelo tratamento com hidrogênio (desoxigenação, hidrogenação ou hidroprocessamento de hidrogênio) de lipídeos. No tratamento com hidrogênio, os acil gliceróis são convertidos nos alcanos correspondentes (parafina). Os alcanos (parafina) podem ainda ser modificados por meio de isomerização ou

por outros processos alternativos. O processo de diesel renovável também pode ser usado para produzir o combustível de jato e/ou a gasolina. Além disso, o craqueamento dos lipídeos pode ser executado para produzir biocombustíveis. Além disso, os lipídeos podem ser usados como biocombustíveis diretamente em determinadas aplicações.

[0084] Os lipídeos produzidos com o método também podem ser usados como óleos base para lubrificantes (óleos de lubrificação) ou como um material de partida para a produção de óleos base para lubrificantes.

#### **Matéria seca**

[0085] "OM" ou "peso seco" refere-se aqui à matéria seca e é uma medida da massa de um material quando ele foi sujeito a um tratamento que remove essencialmente a água do material (isto é, o material é secado completamente).

#### **Consistência**

[0086] "Consistência" refere-se aqui à razão entre o peso seco dos sólidos e o peso total da suspensão.

#### **Método para o fracionamento de um material lignocelulósico**

[0087] A presente invenção provê um método para o fracionamento de um material lignocelulósico para obter o material de carboidrato celulósico separado de uma parte substancial da lignina que foi removida. Opcionalmente, o método também provê uma fração que compreende açúcares hemicelulósicos. O método também provê frações de lignina concentrada. A fração que compreende o material de carboidrato celulósico obtido a partir do material lignocelulósico pode ser usada para a preparação de um meio de cultivo para a produção do lipídeo microbiano tal como descrito no presente documento, em que a fração que compreende o material de carboidrato é combinada opcionalmente com uma fração que compreende açúcares hemicelulósicos

em um cultivo para a produção de lipídeos microbianos.

[0088] Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para o fracionamento de um material lignocelulósico, em que o método compreende

a) a sujeição do material lignocelulósico a um tratamento de deslignificação na presença de um agente de deslignificação alcalina para produzir uma mistura que compreende uma primeira fase sólida e uma primeira fase líquida que contêm lignina dissolvida,

b) a separação da primeira fase sólida da primeira fase líquida,

c) a introdução de um composto catiônico na primeira fase líquida para produzir uma mistura que compreende uma segunda fase sólida e uma segunda fase líquida,

d) a sujeição da primeira fase sólida a um tratamento de hidrólise enzimática na presença de enzimas que podem hidrolisar as frações de hemicelulose e de celulose da primeira fase sólida para produzir uma mistura que compreende uma terceira fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático e uma terceira fase sólida,

e) a separação da terceira fase líquida da terceira fase sólida.

[0089] Os autores da presente invenção constataram que, ao combinar a etapa de deslignificação alcalina com a aplicação subsequente de um composto catiônico, a lignina solubilizada pode ser removida, permitindo que a fase líquida do material seja reciclada sem uma etapa de precipitação da lignina com a redução do pH.

[0090] Em uma modalidade preferida da presente invenção, a segunda fase líquida é separada da segunda fase sólida e a segunda fase líquida é reciclada para a etapa a). Com a reciclagem da segunda fase líquida e desse modo ao realizar uma ou mais rodadas das etapas a) a e), mais lignina pode ser removida da fase líquida. Desse mo-

do, o material pode ser sujeito a dois ciclos repetidos de deslignificação alcalino (lignina solubilizada) seguidos pelo tratamento com o composto catiônico (removendo a lignina solubilizada) antes que os açúcares celulósicos sejam sujeitos à hidrólise enzimática.

### **Etapa de deslignificação usando um agente de deslignificação alcalina**

[0091] Na etapa a) do método de fracionamento de material lignocelulósico, a primeira fase sólida (que compreende o material lignocelulósico opcionalmente do qual o material hemicelulósico foi removido em parte) é sujeitada a uma etapa de deslignificação alcalina, em que pelo menos uma parte da lignina é solubilizada. A deslignificação alcalina é executada ao sujeitar o material lignocelulósico (opcionalmente do qual o material hemicelulósico foi removido em parte) a um agente de deslignificação alcalina.

[0092] O tratamento com álcali é tipicamente realizado ao preparar uma suspensão que compreende o material de lignocelulose (opcionalmente tratado hidrotermicamente ou auto-hidrolisado), líquido aquoso, e um ou mais produtos químicos alcalinos, ou as misturas destes para colocar o pH da suspensão acima de um pH 7. O produto químico de preferência alcalino é adicionado a uma quantidade para obter um pH de uma suspensão entre 10 e 13.

[0093] A suspensão alcalina é mantida a temperaturas em que a suspensão contém pelo menos uma fase líquida. A incubação não é limitada a nenhuma certa temperatura, mas pode ser realizada na ampla faixa de temperatura isotérmica ou não isotermicamente. A incubação é realizada de preferência a temperaturas de 25°C a 160°C, com mais preferência de 25 a 120°C.

[0094] A agitação é opcionalmente realizada para aumentar a eficácia da transferência de calor durante a incubação. O tempo de tratamento é selecionado de acordo com o grau pretendido do material

da dissolução. De preferência, o tempo do tratamento é de meia hora a vinte horas.

[0095] Após o tempo de reação, a fase líquida e a fase sólida são separadas ao usar qualquer método tal como, mas sem ficar elas limitado, a filtração, por exemplo, a filtração por prensagem ou a prensagem com parafuso. A fase sólida é usada para a hidrólise enzimática liberar açúcares para um uso adicional tal como a produção de óleo microbiano. A fase líquida pode ser tratada para precipitar a lignina, tal como pelo tratamento ácido e a lignina precipitada pode ser separado por qualquer método.

[0096] Em uma modalidade da presente invenção, o agente de deslignificação alcalina é selecionado de um grupo que consiste em hidróxido de sódio, carbonato de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, hidróxido de cálcio e carbonato de cálcio, hidróxido de lítio, carbonato de lítio, hidróxido de amônio, amônia, sulfeto de sódio e hidratos correspondentes. Em uma modalidade preferida, o agente de deslignificação alcalina é o hidróxido do sódio. Em uma modalidade preferida, o agente de deslignificação alcalina é o carbonato de sódio.

[0097] De acordo ainda com uma outra modalidade da invenção, o deslignificação do material lignocelulósico é executada com o amônio como agente químico da deslignificação. De acordo com uma modalidade da invenção, da expansão da fibra de amônio (AFEX) ou amônia.

[0098] Tal como acima mencionado, os autores da presente invenção constataram surpreendentemente que a deslignificação alcalina pode ser realizada eficazmente sem a aplicação excessiva do agente de deslignificação alcalina se o material lignocelulósico for sujeito a um tratamento hidrotérmico, tal como a auto-hidrólise, antes da deslignificação alcalino. O tratamento hidrotérmico resulta em uma acidez diminuída da fração sólida (que compreende celulose, lignina e

hemicelulose residual). Portanto, na etapa de deslignificação alcalina, o agente menos alcalino é necessário em comparação à situação quando o tratamento hidrotérmico não é executado. Portanto, o tratamento alcalino depois do tratamento hidrotérmico pode ser executado a um pH mais baixo em comparação à situação sem auto-hidrólise. Desse modo, o tratamento hidrotérmico é vantajoso antes do tratamento alcalino do material lignocelulósico. Uma vantagem de aplicar quantidades menores do agente de deslignificação alcalina é que menos açúcar é perdido na etapa de deslignificação alcalina em comparação a um tratamento similar realizado na presença de grandes quantidades de agente de deslignificação alcalina.

[0099] Por conseguinte, em uma modalidade preferida da presente invenção, a concentração do agente de deslignificação é de 0,1 a 10% em peso, com mais preferência de 0,1 a 4% em peso, com base na quantidade de material lignocelulósico na base de matéria seca. Em uma outra modalidade, o agente de deslignificação alcalina é adicionado ao material lignocelulósico para obter uma suspensão que tem um pH acima de 7, de preferência entre 10 e 13.

[00100] Em uma modalidade adicional, o tratamento de deslignificação é realizado a uma temperatura acima de 25, de preferência entre 30 e 160°C.

#### **Etapa de recuperação de lignina ao usar um composto catiônico**

[00101] Na etapa b) do método para o fracionamento de material lignocelulósico, o licor obtido a partir do produto de deslignificação alcalino (ao separar a mistura da primeira fase sólida e da primeira fase líquida) é sujeito a um tratamento com um composto catiônico a fim de remover a lignina do material. O composto catiônico captura a lignina solubilizada na fase líquida (primeira fase líquida) obtida da separação do produto da deslignificação alcalino.

[00102] O licor da deslignificação alcalina obtido a partir do trata-

mento de deslignificação alcalina compreende material orgânico e inorgânico tal como a lignina e um outro material solúvel em álcali. A dita solução alcalina (licor de deslignificação alcalina) tem uma acidez de  $7 > \text{pH} < 14$ . Um ou mais compostos catiônicos são adicionados à solução alcalina a uma dosagem suficiente para precipitar o material orgânico previamente solúvel. Por conseguinte, a precipitação é obtida sem acidificação da solução alcalina de modo que o pH da solução alcalina permanece essencialmente inalterado.

[00103] A fração sólida precipitada é separada da solução alcalina pelos meios convencionais, produzindo desse modo uma "solução alcalina clarificada" e uma fração sólida precipitada que compreende o material orgânico precipitado e a substância catiônica. A fração sólida precipitada pode ser dessa maneira usada ou então tratada para recuperar as substâncias catiônicas. De preferência, a lignina separada pode ser usada para aplicações de valor adicionado em comparação ao valor da combustão. Opcionalmente, a fração separada de lignina é lavada.

[00104] A solução alcalina clarificada é reciclada para a etapa de tratamento alcalino, e o licor da deslignificação alcalina produzido é precipitado outra vez tal como descrito acima. Opcionalmente, a solução alcalina clarificada é misturada com álcali fresco e/ou um líquido para substituir as quantidades consumidas no tratamento alcalino. O processo é repetido até que o licor de deslignificação alcalina fique saturado com as substâncias não precipitadas.

[00105] Em uma modalidade da presente invenção, o composto catiônico é selecionado de um grupo que compreende polímeros e oligômeros catiônicos tais como polissacarídeos de amido catiônicos, amilose catiônica, amilopectina catiônica, dextrana catiônica, oligômeros de lignina catiônicos, polímeros de lignina catiônicos, turfa catiônica, ou as misturas destes. Em uma outra modalidade preferida, o

composto catiônico é um polímero de amido catiônico.

[00106] Em uma modalidade adicional, os polímeros e os oligômeros catiônicos têm uma densidade de carga catiônica de 0,5 a 5 meq/g.

[00107] Em uma modalidade, o composto catiônico é um íon catiônico elemental selecionado do grupo que compreende metais alcalinos terrosos e cátions bivalentes e trivalentes de ferro (Fe). Em uma outra modalidade, o íon catiônico pode ser derivado de compostos tais como cloreto de alumínio  $Al_2Cl_3$ , acetato de bário  $Ba(C_2H_3O_2)_2$ , bicarbonato de bário  $Ba(HCO_3)_2$ , brometo de bário  $BaBr_2$ , cloreto de bário  $BaCl_2$ , formato de bário  $Ba(HCO_2)_2$ , hidróxido de bário  $Ba(OH)_2$ , nitrato de bário  $Ba(NO_3)_2$ , acetato do cálcio  $Ca(C_2H_3O_2)_2$ , bicarbonato de cálcio  $Ca(HCO_3)_2$ , brometo de cálcio  $CaBr_2$ , cloreto de cálcio  $CaCl_2$ , formato de cálcio  $Ca(HCO_2)_2$ , hidróxido de cálcio  $Ca(OH)_2$ , nitrato de cálcio  $Ca(NO_3)_2$ , acetato de magnésio  $Mg(C_2H_3O_2)_2$ , bicarbonato de magnésio  $Mg(HCO_3)_2$ , brometo de magnésio  $MgBr_2$ , cloreto de magnésio  $MgCl_2$  cloreto, formato de magnésio  $Mg(HCO_2)_2$ , hidróxido de magnésio  $Mg(OH)_2$ , nitrato de magnésio  $Mg(NO_3)_2$ , acetato de ferro  $Fe(C_2H_3O_2)_2$ , cloreto férrico  $FeCl_3$ , e os hidratos correspondentes. Em uma modalidade preferida, a quantidade de composto catiônico é de 0,001 a 0,25 g/g, com base no teor de matéria seca da primeira fase líquida. Em uma outra modalidade preferida, o composto catiônico é o cloreto de alumínio.

[00108] Em uma modalidade da presente invenção, uma mistura de compostos catiônico é usada pelo método, tal como uma mistura de polímeros catiônicos, uma mistura de íons catiônicos ou uma mistura de íons catiônicos e polímeros catiônicos, tal como uma mistura de composto catiônico, em que a mistura compreende ou consiste em um polímero de amido catiônico e cloreto de alumínio.

[00109] Desse modo, tal como acima mencionado, a segunda fase

líquida que ainda compreende carboidratos pode ser desse modo reciclada e introduzida na etapa a) e sujeitada a uma outra rodada da etapa de deslignificação alcalina seguida opcionalmente por um tratamento com um composto catiônico (tal como ilustrado na Figura 1). A reciclagem da segunda fase líquida pode feita sem a adição necessária do agente de deslignificação alcalina, ao contrário da situação na qual a lignina solubilizada foi precipitada com ácido em vez da aplicação de um composto catiônico.

[00110] Desse modo, em uma modalidade adicional, a segunda fase líquida é separada da segunda fase sólida e a segunda fase líquida é reciclada para a etapa a).

[00111] De acordo com a invenção, a lignina pode ser precipitada do licor de deslignificação alcalina sem a mudança do pH por compostos catiônicos e o licor da deslignificação alcalina clarificado (após a remoção) do material precipitado de lignina pode ser reciclado para a etapa de deslignificação alcalina. Isso é vantajoso, uma vez que a quantidade de agente alcalino (fresco) da composição para o tratamento alcalino é menor em comparação a um caso no qual o pH tem que ser reduzido por compostos ácidos para a recuperação de lignina.

#### **Etapa opcional de remoção parcial dos açúcares hemicelulósicos do material lignocelulósico antes da deslignificação alcalina**

[00112] O método para o fracionamento de material lignocelulósico pode incluir opcionalmente uma etapa na qual a hemicelulose é removida pelo menos parcialmente do material lignocelulósico para produzir uma fase líquida que compreende a hemicelulose e a fase sólida do material lignocelulósico, que é introduzida na etapa a) do método (tal como ilustrado na Figura 2).

[00113] Desse modo, em uma modalidade, o material lignocelulósico é sujeito a um tratamento, em que a hemicelulose é removida pelo menos parcialmente do material lignocelulósico enquanto um material

lignocelulósico hidrolisado de hemicelulose aquoso é sujeito à etapa a). Em uma modalidade adicional, pelo menos uma parte do hidrolisado hemicelulósico aquoso é combinada com a primeira fase sólida e sujeitada ao tratamento de hidrólise enzimática.

[00114] Nesta etapa opcional do método do fracionamento, as hemiceluloses são pelo menos em parte dissolvidas e separadas em uma fase líquida que compreende as hemiceluloses.

[00115] Segue-se que o hidrolisado de lignocelulose obtido pelo método da presente invenção pode ser obtido por um ou mais tratamentos da lignocelulose ou do material lignocelulósico incluindo a hidrólise (tratamento hidrotérmico e/ou auto-hidrólise), a explosão de vapor com ou sem a adição de ácidos, uma ou mais etapas de deslignificação, antes que o material lignocelulósico seja sujeito ao agente de deslignificação alcalina na etapa de deslignificação alcalina.

[00116] Em uma modalidade da presente invenção, a hemicelulose é removida pelo menos em parte do material lignocelulósico pelo tratamento hidrotérmico. Em uma segunda modalidade, o tratamento hidrotérmico é realizado a uma temperatura entre 100 e 250°C, de preferência entre 140 e 240°C, e com mais preferência entre 140 e 200°C. A intensificação do tratamento hidrotérmico pode ser expressa em termos da gravidade, cujo termo é definido no presente documento. Em uma modalidade preferida, o tratamento hidrotérmico é realizado nas condições que correspondem a uma gravidade entre 2,0 e 4,5, com mais preferência entre 3,0 e 4,1, e ainda com maior preferência entre 3,5 e 4,0.

[00117] Em uma outra modalidade da presente invenção, a hemicelulose é removida pelo menos em parte do material lignocelulósico pelo tratamento de auto-hidrólise. A auto-hidrólise é executado tipicamente a 5 a 60% de matéria seca, a temperaturas entre 140 e 240°C por 1 a 120 minutos sem a adição de compostos ácidos, resultando na

dissolução de 5 a 40% do teor de matéria seca no material lignocelulósico incluindo carboidratos hemicelulósicos. Tipicamente, a auto-hidrólise dissolve de 30 a 100% de carboidratos hemicelulósicos do material lignocelulósico, de preferência > 50%, com mais preferência > 70%, ainda com maior preferência > 80%, e com a máxima preferência > 90%. Os carboidratos de hemicelulose dissolvidos estão pelo menos em parte na forma oligomérica. Mais tipicamente, a auto-hidrólise é executada a um teor de 10 a 50% de matéria seca a 160 a 220°C, dependendo do material lignocelulósico bruto. Após a auto-hidrólise, as fases sólida e líquida são separadas por qualquer método, tal como a filtração, por exemplo, filtração com pressão, ou por uma prensa de parafuso. A fração sólida pode ser lavada para remover a hemicelulose dissolvido da fase sólida.

[00118] De acordo ainda com uma outra modalidade da invenção, o material lignocelulósico é sujeito a um vapor ou explosão de vapor com ou sem adição de compostos ácidos, em geral a temperaturas entre 110 e 250°C, mais tipicamente a temperaturas entre 140 e 23°C. O tratamento resulta na dissolução de carboidratos hemicelulósicos. Opcionalmente, o material sólido da explosão de vapor é lavado para recuperar os carboidratos hemicelulósicos dissolvidos.

[00119] Em uma modalidade, o material lignocelulósico, do qual pelo menos uma parte da hemicelulose é removida, é sujeito a uma explosão de vapor antes de ser introduzido na etapa a). Em uma outra modalidade da presente invenção, o material lignocelulósico é sujeito primeiramente ao tratamento hidrotérmico seguido por uma etapa de explosão de vapor. Em uma outra modalidade, a fase sólida obtida no tratamento hidrotérmico e/ou na auto-hidrólise é sujeitada a uma explosão de vapor antes do tratamento de deslignificação na presença do agente de deslignificação alcalina.

[00120] De acordo com a invenção, foi constatado surpreendente-

mente que o método de tratamento de lignocelulose que inclui ambas a etapa de tratamento na qual os açúcares hemicelulósicos se tornam dissolvidos pelo menos em parte (tal como a auto-hidrólise) e a etapa de tratamento de deslignificação alcalino (tal como o tratamento com NaOH) permitem um elevado rendimento global (total) de açúcar no processo. O elevado rendimento total de açúcar é vantajoso para a economia dos processos microbianos tais como a produção de óleo de uma só célula.

### **Hidrólise enzimática do produto de deslignificação**

[00121] Na etapa d) do método de fracionamento de material lignocelulósico, a primeira fase sólida obtida a partir da etapa de fracionamento ao usar um composto catiônico também é sujeitada à hidrólise enzimática. Em uma modalidade alternativa, onde a parte substancial da lignina foi removida por etapas repetidas de deslignificação alcalina e tratamento do composto catiônico subsequente, a segunda fase líquida pode ser usada em uma hidrólise enzimática para obter a terceira fase líquida que compreende os açúcares celulósicos.

### **Hidrólise enzimática**

[00122] A hidrólise enzimática consiste na incubação de palha pré-tratada ou um outro substrato ou material bruto, com uma mistura de enzimas, que consiste tipicamente, mas sem ficar a elas limitada, 1,4- $\beta$ -glucanases (endoglucanases e exoglucanases, ou endocelulases e exocelulases), 1,4- $\beta$ -glucosidases (celobiases) e enzimas de degradação da hemicelulose (hemicelulases, xilanases, arabinases etc.). As enzimas podem ou não ser produtos de enzimas comerciais. O material lignocelulósico fracionado (pré-tratado) é misturado com a solução de água ou tampão e a mistura de enzimas em proporções apropriadas. Aditivos, tais como polietileno glicol, detergentes ou outros agentes tensoativos, ou proteínas, podem ou não ser adicionados à reação. Qualquer proporção de sólidos na suspensão (ou "consistência") pode

ser usada, de preferência de 10 a 35%, ou em particular de 15 a 25%. O pH da pasta é ajustado de acordo com as condições ideais para a mistura de enzimas usada. O ajuste do pH é feito antes e/ou durante a adição das enzimas mediante a adição de um ácido ou uma base a uma concentração apropriada, por exemplo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, HNO<sub>3</sub>, NaOH, NH<sub>3</sub> ou um outro ácido ou base. Um outro ajuste do pH pode ou não ser feito após a adição das enzimas e durante a hidrólise.

[00123] Uma temperatura constante é mantida durante a hidrólise, de acordo com as condições ideais da mistura de enzimas, frequentemente de 40 a 60°C, ou em particular de 50°C. A palha pré-tratada, água e/ou a solução tampão e outros constituintes da suspensão de hidrólise podem ou não ser pré-aquecidos até a temperatura da reação antes de ser adicionados à suspensão. A suspensão é agitada durante a reação por meio de agitação, sacudidelas, queda livre ou outros meios de agitação.

[00124] Em uma modalidade da presente invenção, o tratamento de hidrólise enzimática do material lignocelulósico é realizado ao sujeitar o material lignocelulósico a uma mistura de enzimas na presença da água ou um tampão. A mistura de enzimas consiste tipicamente, mas sem ficar a elas limitada, 1,4-β-glucanases (endoglucanases e exoglucanases, ou endocelulases e exocelulases), 1,4-β-glucosidases (celobioses) e enzimas de degradação de hemicelulose (hemicelulases, xilanases, arabinases, etc.).

[00125] Com a sujeição da primeira fase sólida obtida a partir da etapa de deslignificação alcalina à hidrólise enzimático, mais lignina é removida do material na forma de lignina sólida (terceira fase sólida). A fase líquida obtida a partir da hidrólise enzimática compreende os açúcares liberados do material. A terceira fase líquida também é indicada como hidrolisado enzimático, o qual pode ser usado para a produção de lipídeos microbianos.

[00126] Uma parte dos açúcares hemicelulósicos, que são separados opcionalmente do material, por exemplo, por meio do tratamento hidrotérmico ou da auto-hidrólise), pode ser introduzida no sistema e ser sujeitada à hidrólise enzimática junto com o material da fase sólida obtido a partir da etapa de deslignificação alcalina.

[00127] Desse modo, pelo menos uma parte da hemicelulose separada (fase líquida) pode ser adicionada a e misturada com a fase sólida da etapa de deslignificação alcalina (a primeira fase sólida) antes que essa mistura seja sujeitada ao tratamento de hidrólise enzimática da etapa d). Desse modo, em uma modalidade da invenção, pelo menos uma parte da primeira fase líquida é combinada com a segunda fase sólida e sujeitada ao tratamento de hidrólise enzimática.

[00128] Em uma modalidade, a hidrólise enzimática é realizada como uma hidrólise descontínua.

#### **Hidrólise descontínua**

[00129] A hidrólise descontínua refere-se a uma reação de hidrólise, na qual os constituintes da reação são misturados para formar uma suspensão ou uma massa fluida ou uma pasta, e incubada por um período de tempo apropriado, depois do qual os sólidos são separados por meio de filtração, centrifugação ou outros meios de separação, e é adquirida uma corrente líquida de açúcares solúveis, incluindo a glicose, a xilose, a arabinose, a galactose, a manose e outros, e seus oligômeros. Os constituintes da reação ou outras substâncias podem ou não ser adicionados durante a reação. No entanto, nenhuma corrente líquida é separada da pasta antes do final da reação.

[00130] Uma reação descontínua também pode ser executada como um processo contínuo. Em uma hidrólise de batelada contínua, uma corrente constante de palha pré-tratada, líquido, enzimas, agentes de ajuste do pH e outros constituintes da reação, é alimentada no reator enquanto uma corrente constante da pasta é removida simulta-

neamente do reator, da qual a corrente líquida é separada. Em uma hidrólise de batelada contínua, o reator pode ou não ser subdividido em dois ou mais reatores em série, através dos quais a pasta flui constantemente, em particular a fim de melhorar a distribuição do tempo de retenção do material bruto. Conceptualmente, o material sólido é separado do líquido somente depois da reação e nenhuma separação ocorre durante a reação. Portanto, nenhuma separação ocorre para a pasta de saída de outros reatores com exceção da pasta do último reator e, por conseguinte, nenhuma outra corrente líquida separada é removida da pasta além da corrente líquida proveniente da separação da pasta de saída final. No entanto, a alimentação adicional de constituintes da reação pode ocorrer em algum ponto do processo. Se a separação do líquido ocorrer entre dois reatores, os reatores devem ser definidos como etapas separadas da reação e o processo de hidrólise deve ser definidos como uma hidrólise sequencial (por etapas).

[00131] Em uma segunda modalidade da presente invenção, a hidrólise enzimática é realizada como uma hidrólise sequencial.

### **Hidrólise sequencial**

[00132] A hidrólise sequencial, também conhecida como hidrólise por etapas, ou hidrólise de dois estágios, três estágios ou múltiplos estágios, etc., consiste em uma sequência de reações descontínuas em série, onde entre as reações descontínuas, uma corrente líquida é separada da pasta e a corrente sólida concentrada é alimentada na reação descontínua seguinte e misturada com água fresca e/ou uma solução tampão. A adição de enzimas frescas e outros constituintes da reação pode ou não ocorrer na segunda, terceira ou na última reação. O tempo de reação pode ser igual ou diferente nas etapas de reação subsequentes.

[00133] Similarmente tal como descrito para reações descontínuas, a hidrólise sequencial pode ser executada como um processo contínuo

e as etapas da reação individuais da hidrólise sequencial podem ser subdivididas em reatores separados em série, através dos quais a pasta flui constantemente. A separação do líquido e da adição de líquido fresco pode ou não ocorrer entre os reatores. Conceptualmente, se o líquido for separado e o líquido for ou não substituído por um líquido fresco entre dois reatores, os reatores devem ser definidos como etapas de reação separadas.

[00134] Em ainda uma modalidade adicional, a hidrólise enzimática é realizada como uma hidrólise de reciclagem de sólidos.

### **Reciclagem de sólidos residuais na hidrólise enzimática (ou "reciclagem de sólidos")**

[00135] Um processo de hidrólise com reciclagem de sólidos residuais, ou "reciclagem de sólidos", inclui uma reação de hidrólise, depois da qual uma corrente líquida é separada da pasta e uma proporção da corrente contínua concentrada é reciclada de volta ao mesmo reator (Figura 5). A proporção de sólidos residuais reciclados é chamada taxa de reciclagem e denotada por  $r$  na Figura 5 e nas Equações 2 e 3. A uma taxa de alimentação constante do material bruto, a reciclagem de sólidos estende-se pelo tempo de reação do material sólido de acordo com uma série geométrica, apresentada na Equação 2, onde  $t_n$  é o tempo médio de reação dos sólidos depois de  $n$  reações de reciclagem subsequentes,  $t_0$  é o tempo de reação de uma única reação, ou o tempo de retenção da pasta no reator, e  $r$  é a taxa de reciclagem. Eventualmente, um processo de reciclagem a uma taxa de alimentação e reciclagem constante e um tempo de retenção constante irá alcançar um estado estável, em que o tempo médio de reação do material sólido pode ser calculado a partir da Equação 3.

$$t_n = \sum_{i=0}^{n-1} t_0 r^i = t_0 \frac{1 - r^n}{1 - r} \quad (2)$$

$$t_{Std} = \sum_{i=0}^{\infty} t_0 r^i = \frac{t_0}{1-r} \quad (3)$$

[00136] Por exemplo, a uma taxa de reciclagem de 50% em uma reação de 24 horas, o tempo médio de reação dos sólidos será de 48 horas no estado estável.

[00137] A reação de reciclagem pode ser executada como uma reação descontínua, depois da qual a reciclagem dos sólidos ocorre, ou como um processo contínuo, onde os constituintes do processo são alimentados constantemente no reator, um fluxo de saída constante da pasta ocorre e a pasta de saída é separada em um líquido e uma corrente sólida residual concentrada e um fluxo constante de sólidos residuais é reciclado de volta ao reator. A reação de reciclagem pode ou não ser subdividida em reatores separados em série a fim de melhorar a distribuição do tempo de residência e a separação do líquido de ou depois desses reatores e a alimentação adicional de constituintes do processo nesses reatores pode ou não ocorrer. Etapas de reação sequenciais adicionais podem ou não ser incluídas após ou antes ou durante da reação de reciclagem de sólidos.

[00138] O material hemicelulósico obtido opcionalmente mediante a sujeição do material lignocelulósico ao tratamento hidrotérmico ou à auto-hidrólise pode ser reintroduzido (pelo menos em parte) na etapa de hidrólise enzimática. Por conseguinte, em uma modalidade da presente invenção, pelo menos uma parte do hidrolisado hemicelulósico aquoso é combinada com a primeira fase sólida e sujeitada ao tratamento de hidrólise enzimática.

[00139] O hidrolisado enzimático líquido obtido na etapa d) pode ser sujeito a uma etapa de concentração do hidrolisado para obter um hidrolisado concentrado, tal como por meio de evaporação, a fim de obter uma fração que tem uma concentração mais elevada de carboidratos celulósicos.

[00140] Desse modo, em uma modalidade, o método de acordo com a invenção também compreende uma etapa de concentração da terceira fase líquida. De preferência, a concentração da terceira fase líquida é realizada por meio de evaporação.

#### **Hidrolisado enzimático líquido (terceira fase líquida)**

[00141] A fase líquida (o hidrolisado enzimático) obtida na etapa d) do método da invenção compreende açúcares liberados do material de partida provido na etapa a) do método ou na etapa de tratamento hidrotérmica e/ou auto-hidrólise prévia opcional. A fase líquida que compreende os açúcares pode ser usada na preparação de um meio de cultivo, tal como o cultivo para o uso em um método para a produção de lipídeos microbianos tal como descrito no presente documento.

[00142] Por conseguinte, um segundo aspecto da presente invenção refere-se a uma fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático que pode ser obtido pelo método da presente invenção (a terceira fase líquida).

[00143] Alternativamente, a fase líquida do hidrolisado enzimático pode ser concentrada para obter um licor que tem uma concentração mais elevada de açúcares. Desse modo, um aspecto adicional da presente invenção provê um hidrolisado concentrado de açúcar que pode ser obtido pelo método da presente invenção.

[00144] O hidrolisado hemicelulósico da primeira fase líquida (que compreende monômeros de açúcar hemicelulósicos) e o hidrolisado enzimático, a terceira fase líquida (que compreende açúcares celulósicos) podem ser usados no caldo de cultivo sozinhos ou ser misturados juntos como fontes de carbono para a produção do óleo de uma só célula.

#### **Método para a produção de lipídeo microbiano**

[00145] Um aspecto adicional da presente invenção refere-se a um método para a produção de lipídeo microbiano, em que o método

compreende

(i) a provisão de um meio de cultivo que compreende o líquido na forma de um hidrolisado enzimático obtido pelo método para o fracionamento de um material lignocelulósico (a terceira fase líquida) ou do hidrolisado de açúcar concentrado da presente invenção,

(ii) a provisão de um caldo de fermentação mediante a inoculação do meio de cultivo com um micróbio oleaginoso,

(iii) a incubação do dito meio inoculado com o dito micróbio oleaginoso, permitindo que o lipídeo se acumule,

(iv) a recuperação do lipídeo do dito micróbio oleaginoso.

[00146] O método da invenção também é indicado como um único processo de produção de óleo de uma só célula. O método da presente invenção pode fazer parte do processo para a produção de biocombustíveis tal como descrito no presente documento, em que o óleo ou pelo menos uma parte do óleo é provido na forma de óleo microbiano pelo método descrito no presente documento.

[00147] De acordo com a modalidade preferida da invenção, o meio de cultivo compreende açúcares lignocelulósicos derivados da celulose e/ou da hemicelulose. De acordo com a invenção, as frações de hemicelulose e/ou de celulose da biomassa lignocelulósica são usadas como matérias primas para a produção de óleo microbiano (óleo de uma só célula) no mesmo processo (sistema de biorreator). O processo usa de preferência o micróbio oleaginoso que pode utilizar açúcares C6 (por exemplo, xilose, arabinose) e C5 (por exemplo, glicose, manose, galactose).

[00148] De acordo com uma outra modalidade da invenção, o meio de cultivo compreende os açúcares hemicelulósicos derivados de lignocelulose. De acordo ainda com uma outra modalidade da invenção, os açúcares hemicelulósicos estão pelo menos em parte na forma oligomérica quando alimentados em um processo de produção de óleo

de uma só célula.

[00149] Em uma modalidade preferida da presente invenção, o método para a produção do lipídeo microbiano de acordo com a reivindicação precedente, em que o método compreende

a) a sujeição do material lignocelulósico a um tratamento de deslignificação na presença de um agente de deslignificação alcalina para produzir uma mistura que compreende uma primeira fase sólida e uma primeira fase líquida que contém lignina dissolvida,

b) a separação da primeira fase sólida da primeira fase líquida,

c) a introdução de um composto catiônico na primeira fase líquida para produzir uma mistura que compreende uma segunda fase sólida e uma segunda fase líquida,

d) a sujeição da primeira fase sólida a um tratamento de hidrólise enzimática para hidrolisar as frações de hemicelulose e de celulose da primeira fase sólida para produzir uma mistura que compreende uma terceira fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático e uma terceira fase sólida que compreende a lignina,

(i) a provisão de um meio de cultivo que compreende a terceira fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático da etapa d),

(ii) a provisão de um caldo de fermentação mediante a inoculação do meio de cultivo com um micróbio oleaginoso,

(iii) a incubação do dito meio inoculado com o dito micróbio oleaginoso, permitindo que o lipídeo se acumule,

(iv) a recuperação do lipídeo do dito micróbio oleaginoso.

Antes de introduzir o material lignocelulósico na etapa a) e sujeitar o mesmo à deslignificação alcalina, o material lignocelulósico pode ser opcionalmente pré-tratado para separar ou separar parcialmente a hemicelulose do material.

[00150] Desse modo, em uma modalidade, o material lignocelulósi-

co é sujeito a um tratamento, em que a hemicelulose é removida pelo menos parcialmente do material lignocelulósico como um hidrolisado de hemicelulose aquoso antes da etapa a).

[00151] Os micróbios usados pelo método de produção de lipídeos microbianos são micróbios oleaginosos. Os micróbios oleaginosos (tal como descrito no presente documento) podem acumular lipídeos intercelulares de maneira tal que os lipídeos somam pelo menos 15% (em peso/peso) da biomassa total (por peso seco da célula) do micróbio quando ele é cultivado sob condições apropriadas. Em uma modalidade preferida, o micróbio oleaginoso pode acumular pelo menos 20% (em peso/peso) da biomassa total do micróbio (por peso seco da célula). Em uma modalidade da presente invenção, o micróbio oleaginoso usado para a produção de lipídeos é selecionado de um grupo que compreende levedura e fungos filamentosos. De preferência, um método para a produção do lipídeo microbiano é realizado sob a condição aeróbica. Desse modo, em uma modalidade da presente invenção, a incubação na etapa (iii) é realizada como cultivo aeróbico, tal como descrito no presente documento.

[00152] Quando da descrição das realizações da presente invenção, as combinações e as permutações de todas as realizações possíveis não foram descritas explicitamente. No entanto, o mero fato que determinadas medidas são recitadas em reivindicações dependentes mutuamente diferentes ou descritas em realizações diferentes não indica que uma combinação dessas medidas não pode ser usada de modo vantajoso. A presente invenção considera todas as combinações e permutações possíveis das realizações descritas.

[00153] Os termos "que compreende", "compreendem" e "compreende" no presente documento, segundo o requerente, podem ser substituídos opcionalmente pelos termos "que consiste", "consistem" ou "consiste", respectivamente, em cada caso.

[00154] Quando da descrição das realizações da presente invenção, as combinações e as permutações de todas as realizações possíveis não foram descritas explicitamente. No entanto, o mero fato que determinadas medidas são recitadas em reivindicações dependentes mutuamente diferentes ou descritas em realizações diferentes não indica que uma combinação dessas medidas não pode ser usada de modo vantajoso. A presente invenção considera todas as combinações e permutações possíveis das realizações descritas.

[00155] Os termos "que compreende", "compreendem" e "compreende" no presente documento, segundo o requerente, podem ser substituídos opcionalmente pelos termos "que consiste", "consistem" ou "consiste", respectivamente, em cada caso.

### **Itens**

[00156] A seguir, a invenção é descrita por itens não limitadores.

Item 1. Método para o fracionamento de um material lignocelulósico, em que o método compreende

a) a sujeição do material lignocelulósico a um tratamento de deslignificação na presença de um agente de deslignificação alcalina para produzir uma mistura que compreende uma primeira fase sólida e uma primeira fase líquida que contém lignina dissolvida,

b) a separação da primeira fase sólida da primeira fase líquida,

c) a introdução de um composto catiônico na primeira fase líquida para produzir uma mistura que compreende uma segunda fase sólida e uma segunda fase líquida,

d) a sujeição da primeira fase sólida a um tratamento de hidrólise enzimática na presença de enzimas que podem hidrolisar as frações de hemicelulose e de celulose da primeira fase sólida para produzir uma mistura que compreende a terceira fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático e uma terceira fase sólida,

e) a separação da terceira fase líquida da terceira fase sólida.

Item 2. O método de acordo com o artigo 1, em que o composto catiônico é selecionado de um grupo que compreende polímeros e oligômeros catiônicos tais como polissacarídeos de amido catiônicos, amilose catiônica, amilopectina catiônica, dextrana catiônica, oligômeros de lignina catiônicos, polímeros de lignina catiônicos, turfa catiônica, ou as misturas destes.

Item 3. O método de acordo com o artigo 2, em que os polímeros e os oligômeros catiônicos têm uma densidade de carga catiônica de 0,5 a 5 meq/g.

[0149] Item 4. O método de acordo com o artigo 1, em que o composto catiônico é um íon catiônico elemental selecionado do grupo que compreende metais alcalinos terrosos e cátions bivalentes e trivalentes de ferro (Fe) ou de alumínio (Al).

Item 5. O método de acordo com o item 4, em que o íon catiônico pode ser derivado de compostos tais como cloreto de alumínio  $Al_2Cl_3$ , acetato de bário  $Ba(C_2H_3O_2)_2$ , bicarbonato de bário  $Ba(HCO_3)_2$ , brometo de bário  $BaBr_2$ , cloreto de bário  $BaCl_2$ , formato de bário  $Ba(HCO_2)_2$ , hidróxido de bário  $Ba(OH)_2$ , nitrato de bário  $Ba(NO_3)_2$ , acetato do cálcio  $Ca(C_2H_3O_2)_2$ , bicarbonato de cálcio  $Ca(HCO_3)_2$ , brometo de cálcio  $CaBr_2$ , cloreto de cálcio  $CaCl_2$ , formato de cálcio  $Ca(HCO_2)_2$ , hidróxido de cálcio  $Ca(OH)_2$ , nitrato de cálcio  $Ca(NO_3)_2$ , acetato de magnésio  $Mg(C_2H_3O_2)_2$ , bicarbonato de magnésio  $Mg(HCO_3)_2$ , brometo de magnésio  $MgBr_2$ , cloreto de magnésio  $MgCl_2$  cloreto, formato de magnésio  $Mg(HCO_2)_2$ , hidróxido de magnésio  $Mg(OH)_2$ , nitrato de magnésio  $Mg(NO_3)_2$ , acetato de ferro  $Fe(C_2H_3O_2)_2$ , cloreto férrico  $FeCl_3$ , e os hidratos correspondentes.

Item 6. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a quantidade de composto catiônico é de 0,001 a

0,25 g/g com baseado no teor de matéria seca da primeira fase líquida.

Item 7. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a segunda fase líquida é separada da segunda fase sólida e a segunda fase líquida é reciclada para a etapa a).

Item 8. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que o agente de deslignificação alcalina é selecionado de um grupo que consiste em hidróxido de sódio, carbonato de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, hidróxido de cálcio e carbonato de cálcio, hidróxido de lítio, carbonato de lítio, hidróxido de amônio, amônia, sulfeto de sódio e hidratos correspondentes.

Item 9. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a concentração do agente de deslignificação é de 0,1 a 10% em peso, com mais preferência de 0,1 a 4% em peso com base na quantidade de material lignocelulósico na base da matéria seca.

Item 10. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que o agente de deslignificação alcalina é adicionado ao material lignocelulósico para obter uma suspensão que tem um pH acima de 7, de preferência entre 10 e 13.

Item 11. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que o tratamento de deslignificação é realizado a uma temperatura acima de 25°C, de preferência entre 30 e 160°C.

Item 12. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que o material lignocelulósico é sujeito a um tratamento no qual a hemicelulose é removida pelo menos parcialmente do material lignocelulósico como um hidrolisado de hemicelulose aquoso, antes que o material lignocelulósico seja sujeito à etapa a).

Item 13. O método de acordo com o item 12, em que a hemicelulose é removida pelo menos em parte do material lignocelulósico.

co pelo tratamento hidrotérmico.

Item 14. O método de acordo com o item 12, em que a hemicelulose é removida pelo menos em parte do material lignocelulósico pelo tratamento de auto-hidrólise.

Item 15. O método de acordo com o item 12, em que o material lignocelulósico, do qual pelo menos uma parte da hemicelulose é removida, é sujeito a uma explosão de vapor antes da etapa a).

Item 16. O método de acordo com o item 12, em que pelo menos uma parte do hidrolisado hemicelulósico aquoso é hidrolisada enzimaticamente, opcionalmente ao combinar o hidrolisado hemicelulósico com a primeira fase sólida antes de sujeitar a mistura ao tratamento de hidrólise enzimática.

Item 17. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a hidrólise enzimática é realizada como uma hidrólise descontínua.

Item 18. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a hidrólise enzimática é realizada como uma hidrólise sequencial.

Item 19. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que a hidrólise enzimática é realizada como uma hidrólise de reciclagem de sólidos.

Item 20. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, o qual também compreende uma etapa de concentração da terceira fase líquida.

Item 21. Uma fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático, a qual pode ser obtida pelo método de acordo com qualquer um dos itens precedentes.

Item 22. Um hidrolisado de açúcar concentrado, o qual pode ser obtido pelo método de acordo com o item 20.

Item 23. Um método para a produção de lipídeo microbiano,

em que o método compreende

(i) a provisão de um meio de cultivo que compreende uma terceira fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático do item 21 ou de hidrolisado de açúcar concentrado de acordo com o item 22,

(ii) a provisão de um caldo de fermentação mediante a inoculação do meio de cultivo com um micróbio oleaginoso,

(iii) a incubação do dito meio inoculado com o dito micróbio oleaginoso, permitindo que o lipídeo se acumule,

(iv) a recuperação do lipídeo do dito micróbio oleaginoso.

Item 24. O método para a produção de lipídeo microbiano de acordo com o item precedente, em que o método compreende

a) a sujeição do material lignocelulósico a um tratamento de deslignificação na presença de um agente de deslignificação alcalina para produzir uma mistura que compreende uma primeira fase sólida e uma primeira fase líquida que contém lignina dissolvida,

b) a separação da primeira fase sólida da primeira fase líquida,

c) a introdução de um composto catiônico na primeira fase líquida para produzir uma mistura que compreende uma segunda fase sólida e uma segunda fase líquida,

d) a sujeição da primeira fase sólida a um tratamento de hidrólise enzimática para hidrolisar as frações de hemicelulose e de celulose da primeira fase sólida para produzir uma mistura que compreende uma terceira fase líquida e uma terceira fase sólida que compreende lignina,

e) a separação da terceira fase líquida da terceira fase sólida,

(i) a provisão de um meio de cultivo que compreende a terceira fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático da etapa e),

(ii) a provisão de um caldo de fermentação mediante a ino-

culação do meio de cultivo com um micróbio oleaginoso,

(iii) a incubação do dito meio inoculado com o dito micróbio oleaginoso, permitindo que o lipídeo se acumule

(iv) a recuperação do lipídeo do dito micróbio oleaginoso.

Item 25. O método de acordo com o item 23 ou 24, em que o micróbio é selecionado do grupo que consiste em levedura e fungos filamentosos.

Item 26. O método de acordo com qualquer um dos itens 23 a 25, em que o material lignocelulósico é sujeito a um tratamento, em que a hemicelulose é removida pelo menos parcialmente do material lignocelulósico como um hidrolisado de hemicelulose aquoso antes da etapa a).

Item 27. O método de acordo com qualquer um dos itens precedentes, em que pelo menos uma parte do hidrolisado hemicelulósico aquoso é combinada com a primeira fase sólida e sujeitada ao tratamento de hidrólise enzimática.

Item 28. O método de acordo com qualquer um dos itens 23 a 25, em que o meio de cultivo compreende pelo menos uma parte da primeira fase líquida.

## **Exemplos**

[00157] A invenção é ilustrada pelos exemplos não limitadores a seguir. A invenção pode ser aplicada a outros materiais brutos lignocelulósicos que não aqueles ilustrados nos exemplos. Deve ser compreendido que as realizações fornecidas na descrição acima e nos exemplos são apenas para finalidades ilustrativas, e que várias mudanças e modificações são possíveis dentro do âmbito da invenção.

### **Exemplo 1**

#### **Auto-hidrólise (com pH pré-ajustado) de palha de trigo**

[00158] Uma suspensão foi preparada ao misturar 20 g de palha de trigo moída previamente para passar por uma tela de 1 mm e 180 g de

água. A suspensão foi ajustada com ácido acético a um pH 4,5. A suspensão foi transferida a um reator de autoclave que foi então aquecido não isotermicamente com uma camisa de aquecimento até a temperatura entre 17°C e 200°C com agitação contínua. Os dados da temperatura durante o aquecimento foram registrados e usados para calcular a gravidade da auto-hidrólise (Equação 1). O reator foi resfriado até cerca de 50°C, e a suspensão foi recuperada manualmente para a filtração. A fração líquida foi separada da fração sólida e furfural e hidróxi metil furfural (HMF) na fração líquida foram medidos ao usar HPLC. A concentração total de açúcar (g/l) na fração líquida foi determinada após a hidrólise ácido diluída que converte açúcares oligoméricos e poliméricos em monossacarídeos. A fração sólida foi lavada com água (0,5 dm<sup>3</sup>) e prensada. O resíduo sólido obtido foi pesado, amostrado para a determinação da matéria seca, e o rendimento do resíduo sólido (%) foi calculado como a razão de peso entre o resíduo sólido e a palha de trigo pesada para o tratamento de auto-hidrólise (100% g de palha de trigo seca/g de resíduo sólido seco). As substâncias fenólicas solúveis no líquido foram determinadas ao usar o método de Folin-Ciocalteu com guaiacol como padrão.

[00159] Os resultados mostrados na Figura 15 e na Figura 16 resumem os resultados. O rendimento do resíduo sólido diminuiu com a gravidade da auto-hidrólise com um rendimento de 67% à gravidade mais elevada ( $\text{Log}(R_0) = 4,4$ ) (Figura 15). A concentração de açúcares monossacarídeos na fração líquida aumentou primeiramente e em seguida diminuiu com o aumento da gravidade da auto-hidrólise. A concentração máxima de açúcar (23,1 g/l) foi obtida quando a gravidade da auto-hidrólise era  $\text{Log}(R_0) = 3,8$ . Além dessa gravidade da auto-hidrólise, a concentração de açúcar na fração líquida diminuiu drasticamente e a concentração de furfural e de HMF aumentou de repente, alcançando uma concentração de 4,8 g/l e 0,3 g/l, respectivamente. Ao

contrário da geração repentina de furfural e de HMF, a concentração de compostos fenólicos solúveis aumentou progressivamente de 0,5 g/l até 2,0 g/l com o aumento da gravidade da auto-hidrólise.

[00160] Este exemplo mostra que as condições ideais de auto-hidrólise em termos da gravidade da auto-hidrólise ( $\text{Log}(R_0)$ ) podem ser selecionadas para evitar a formação adicional de furfural, HMF e compostos fenólicos solúveis, enquanto maximiza a concentração de monossacarídeos na fração líquida.

### **Exemplo 2**

[00161] Uma suspensão foi preparada ao misturar 33,8 kg de palha de trigo picada contendo 11% de umidade com 350 kg de água da torneira conferindo uma consistência de 8,5%. A suspensão foi aquecida até cerca de 60°C, e a fração líquida foi separada dos sólidos por meio de filtração em um filtro Nutsche agitado. A fração sólida (31,2 kg de matéria seca) foi misturada com água para obter 192,4 kg da suspensão a uma consistência de 5%. A suspensão foi aquecida até 180°C e resfriada até a temperatura ambiente, atingindo uma gravidade de  $S = 4,15$ . A fração sólida foi separada da fração líquida em uma centrífuga de decantador. A fração sólida foi lavada com água, e a fração insolúvel lavada de "palha auto-hidrolisada" (15,3 kg de matéria seca) foi recuperada ao usar a centrífuga do decantador, e armazenada em um freezer. Com base na análise de HPLC, a fração líquida (6,3 kg de matéria seca) continha açúcares derivados de hemicelulose mais ou menos à metade de sua matéria seca.

[00162] A separação do líquido e fração sólida e a lavagem opcional da fração sólida separa as substâncias fenólicas solúveis e os ácidos orgânicos liberados na auto-hidrólise da fração sólida auto-hidrolisada. Em consequência disto, o consumo do agente químico de deslignificação alcalina na etapa subsequente de deslignificação é diminuído sinergicamente.

[00163] O exemplo mostra que o auto-hidrólise permite a separação de açúcares hemicelulósicos do material lignocelulósico antes de outros tratamentos de hidrólise. A fração sólida produzida a partir desta experiência foi usada subsequentemente nos testes de deslignificação, que resultaram na fração sólida com baixo teor de lignina e elevado teor de carboidrato.

### **Exemplo 3**

[00164] Uma suspensão foi preparada ao misturar 10,5 kg de palha moída a 7,3% de umidade e 54,1 kg de água da torneira em um recipiente de 100 dm<sup>3</sup>. Depois de um armazenamento à temperatura ambiente por 18 horas, 64,2 kg da suspensão foram colocados em um reator de autoclave agitado de 250 dm<sup>3</sup> cilíndrico horizontal. O reator foi fechado e aquecido dentro de 75 minutos até 140° C, mantido a 140°C por 5 horas e resfriado até a temperatura ambiente dentro de 30 minutos. A suspensão hidrotermicamente tratada foi removida do reator, e as frações líquida e sólida foram separadas por meio de filtração. A fração sólida foi lavada com água da torneira e prensada ao usar uma prensa hidráulica. A fração sólida prensada (20,9 kg) tinha um teor de matéria seca de 42,7%.

[00165] A fração sólida produzida a partir desta experiência foi usada subsequentemente nos testes de deslignificação, que resultaram em uma fração sólida com baixo teor de lignina e elevado teor de carboidrato.

### **Deslignificação de palha auto-hidrolisada**

[00166] A palha auto-hidrolisada contém quantidades consideráveis de lignina, o que causa efeitos inibidores na hidrólise enzimática. Por esta razão, o material sólido da auto-hidrólise é extraído em condições alcalinas para remover a lignina antes da hidrólise enzimática.

### **Exemplo 4**

[00167] Uma suspensão foi preparada ao misturar 20,5 kg (8 kg de

matéria seca) da palha auto-hidrolisada do Exemplo 2 com 262 g de NaOH granular e água da torneira em um reator de aço inoxidável de 180 dm<sup>3</sup> equipado com uma unidade de agitação. A suspensão a uma consistência de 6,6% foi tratada ao aquecer o reator até 95°C dentro de 30 minutos seguido pelo tratamento isotérmico a 95°C por 1 hora com agitação contínua. A fração sólida extraída foi separada da fração líquida por meio de filtração em uma centrífuga, lavada com água da torneira, prensada, e a palha auto-hidrolisada extraída com NaOH (23,64 kg, teor de matéria seca de 27%) foi armazenada a 6°C. A fração líquida ("solução de deslignificação de NaOH") contendo 1,62 kg de material dissolvido da palha auto-hidrolisada foi armazenada a 6°C.

[00168] A hidrólise enzimática da palha auto-hidrolisada extraída com NaOH com uma dose de enzima de 35 µl/g Flashzime Plus (Roal Oy, Finlândia), que era igual a 6 FPU (unidade de papel filtro)/g de DM de atividade de celulase, acarretou um rendimento de 65,0% de açúcar de carboidratos da palha auto-hidrolisada. Este é um resultado melhorado comparado ao rendimento de 61,0% de açúcar de carboidratos de palha auto-hidrolisada sem deslignificação.

[00169] O rendimento do açúcar é calculado como razão entre uma quantidade total de monossacarídeos liberados na hidrólise enzimática da palha auto-hidrolisada extraída com NaOH e uma quantidade total de monossacarídeos liberados de peso similar da palha auto-hidrolisada na hidrólise ácida multiplicada pelo rendimento da matéria seca da palha auto-hidrolisada extraída com NaOH do tratamento de deslignificação.

[00170] Este exemplo mostra que a mesma quantidade de enzima produz um rendimento maior de açúcar na hidrólise enzimática, quando a lignina é removida antes da hidrólise enzimática pelo tratamento alcalino (NaOH). O exemplo também mostra que uma parte de lignina é dissolvida na fração líquida alcalina e que a lignina pode ser recupe-

rada por meio de precipitação.

### **Exemplo 5**

[00171] Uma suspensão a uma consistência de 3,6% foi preparada ao misturar a palha auto-hidrolisada do Exemplo 2 (403 g, 156 g de matéria seca) com 4.050 g de água da torneira e 37,5 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sólido em um reator de vidro equipado com um agitador magnético. O reator foi aquecido até 95 a 100°C em 30 minutos e tratado por 4 horas a 95 a 100°C com agitação contínua da suspensão. 812 g de uma fração sólida extraída com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ("palha auto-hidrolisada extraída com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ") que tem um teor de matéria seca de 15% foram separados da fração líquida (3.325 g) por meio de filtração, lavados com água da torneira, prensados e armazenados a 6°C. O rendimento da fração sólida (DM de palha deslignificada/DM de palha auto-hidrolisada) era de 78%. A fração líquida (solução de deslignificação de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) tinha um pH 9,8 e foi armazenada a 6°C. A quantidade de carbonato usado é maior do que a que  $\text{NaOH}$ , uma vez que o carbonato é uma base mais fraca do que o hidróxido.

[00172] A hidrólise enzimática da palha auto-hidrolisada extraída com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  com uma dose de enzima de 35  $\mu\text{l/g}$  Flashzime Plus (Roal Oy, Finlândia), que era igual a 6 FPU (unidades de papel filtro)/g de DM da atividade do celulase, acarretou um rendimento de 59,1% de açúcar de carboidratos da palha auto-hidrolisada. Este era menor do que o rendimento de 65,0% de açúcar com palha auto-hidrolisada extraída com  $\text{NaOH}$  de carboidratos da palha auto-hidrolisada ou o rendimento de 61,0% de açúcar de carboidratos da palha auto-hidrolisada sem deslignificação.

[00173] O rendimento do açúcar é calculado como a razão entre uma quantidade total de monossacarídeos liberados na hidrólise enzimática e uma quantidade total de monossacarídeos liberados de peso similar da palha auto-hidrolisada na hidrólise ácida multiplicada pelo

rendimento da matéria seca da palha auto-hidrolisada extraída com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  do tratamento de deslignificação.

[00174] Em comparação com a palha auto-hidrolisada que foi sujeitada à hidrólise enzimática sem deslignificação, a vantagem da deslignificação de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  foi que uma fração adicional de lignina (solução de deslignificação de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) foi obtida.

[00175] Este exemplo mostra que a mesma quantidade de enzima produz um rendimento maior de açúcar na hidrólise enzimática, quando a lignina é removida antes da hidrólise enzimática pelo tratamento alcalino ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). O exemplo também mostra que a parte de lignina é dissolvida na fração líquida alcalina e que a lignina pode ser recuperada por meio de precipitação.

### **Exemplo 6**

[00176] Uma suspensão foi preparada ao misturar 10,0 kg (4,41 kg de matéria seca) da palha auto-hidrolisada do Exemplo 3 com água da torneira (29,5 kg) e 3,401 g de NaOH aquoso a 50% (em peso/peso). A suspensão foi tratada em um reator similar e em condições térmicas tal como descrito acima no Exemplo 3. A fração sólida ("palha deslignificada com NaOH"), foi separada por meio de filtração, e após a lavagem tinha um teor de matéria seca de 30,4%. A fração líquida ("solução de deslignificação de NaOH") tinha um pH 13,0 e foi armazenada a 6°C.

### **Exemplo 7**

[00177] A finalidade do exemplo era estudar o efeito do tratamento alcalino da palha auto-hidrolisada na hidrólise enzimática e o rendimento do açúcar da palha auto-hidrolisada. Para conseguir isso, uma suspensão a uma consistência de 7,5% foi preparada ao misturar 15 g de matéria seca da palha auto-hidrolisada do Exemplo 1 com água deionizada e os produtos químicos listados na Tabela 1. Produtos químicos alcalinos diferentes foram usados para ajustar o pH antes do

aquecimento até o valor indicado. A suspensão foi aquecida rapidamente até 90°C em um forno de micro-ondas. A suspensão quente foi filtrada para separar as frações sólida e líquida. A fração sólida foi lavada com água e o bolo do filtro agitado até ficar homogêneo, e o seu teor de matéria seca foi medido. A fração sólida lavada (10 g de matéria seca) foi hidrolisada com 350 µl (6 FPU/g) do preparado celulolítico Flashzime Plus (Roal, Finlândia) a uma consistência de 10% em tampão de acetato de sódio 0,05 M a um pH 5 na presença de sorbato de potássio. A hidrólise foi realizada em um frasco cônico de 250 ml colocado em um conjunto de incubadora termostática a uma reação a 50°C continuada com 200 rpm de agitação por 72 horas. Os açúcares monoméricos liberados foram determinados a partir da fração líquida por meio de HPLC. Os rendimentos obtidos da matéria seca e do açúcar são apresentados na Tabela 1.

[00178] O exemplo mostra que a deslignificação da palha auto-hidrolisada aumenta o rendimento do açúcar da palha auto-hidrolisada pela hidrólise enzimática até mesmo quando as perdas de matéria seca no tratamento de deslignificação são levadas em consideração. Uma outra vantagem do tratamento de deslignificação é a geração da fração de lignina solúvel apropriada para processamento adicional.

[00179] Foi constatado surpreendentemente a partir do exemplo que somente uma pequena quantidade de produto químico alcalino é necessária na deslignificação da palha auto-hidrolisada. Outra constatação surpreendente foi que o pH da fração líquida isolada da fração sólida deslignificada era relativamente baixa, o que significa que uma quantidade menor de ácido é necessária para precipitar a lignina da solução mediante a diminuição do pH.

### **Exemplo 8**

[00180] A finalidade do exemplo era estudar o efeito do amido cationico na precipitação de lignina do licor de deslignificação onde a al-

calinidade é causada por NaOH. No experimento, 15 g da solução de lignina e NaOH a um pH 10 do Exemplo 6 (teor de matéria seca de 1,5%) foram colocados em um tubo de ensaio de vidro. Um peso preciso do amido catiônico "Raifix 25035" (Chemigate, Finlândia) foi adicionado ao tubo de ensaio. O tubo contendo a mistura foi coberto por cortiça de borracha, agitado para misturar os ingredientes, e colocado em repouso à temperatura ambiente. Dependendo da quantidade de amido catiônico adicionado, mas normalmente depois de alguns minutos, a separação das fases na mistura foi observada. Depois de 4 horas, a amostra de 0,1 ml foi retirada da fase superior da mistura diluída 1:10 em água alcalina, centrifugada por 5 minutos a 10.000 g, e a absorvância a 280 nm e a 600 nm foi medida a partir do sobrenadante com diluições apropriadas em água alcalina. Em comparação com a absorvância da solução de lignina não tratada, a diminuição da porcentagem na absorvância a 280 nm ou a 600 nm foi calculada. A diminuição na absorvância do sobrenadante indica a remoção de lignina (precipitação) do líquido pelo composto catiônico (amido catiônico).

[00181] Os resultados na Figura 5 mostram o efeito da dosagem de amido catiônico na diminuição da porcentagem na absorvância UV a 280 nm na matéria dissolvida. O absorvância ficou mais claramente diminuída quando a dosagem de amido catiônico estava entre 0,2 g/g e 0,6 g/g com as quantidades fornecidas na base de matéria seca. Depois de uma incubação de 24 horas, a fase líquida foi removida por decantação e passada através de filtro de vidro de síter com grau de porosidade 1. O material filtrado foi coletado, e testado quanto ao pH, mostrando valores entre pH 9,4 e pH 9,6 e para a solução não tratada um pH 9,5. A dosagem de amido catiônico não podia ser atribuída para a mudança no pH mas, ao invés disto, a diminuição do pH inicial 10 era provavelmente devida à absorção de dióxido de carbono do ar. Ambas a análise gravimétrica e espectrofotométrica conferiram um re-

sultado similar com respeito à precipitação máxima observada.

[00182] Os resultados indicam que o composto catiônico, tal como o amido catiônico, pode ser usado para precipitar lignina do líquido de deslignificação alcalina onde a alcalinidade é causada pelo composto de hidróxido, tal como NaOH, sem ajuste do pH.

### **Exemplo 9**

[00183] A finalidade do exemplo era estudar o efeito do amido catiônico na precipitação de lignina do licor de deslignificação onde a alcalinidade é causada por Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em vez de NaOH. A solução de deslignificação de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a um pH 9,8 do Exemplo 5 foi tratada com o amido catiônico "Raifix 25035" tal como descrito acima, mas com uma dosagem mais baixa de amido catiônico. A diminuição na absorbância a 280 nm depois de uma incubação de 4 horas foi medida em relação à absorbância medida da solução de lignina não tratada. Os resultados apresentados na Figura 6 mostram a tendência de aumento entre a dosagem de amido catiônico e diminuem na absorbância a 280 nm. A diminuição de até 79% na absorbância a 280 nm foi obtida quando a dosagem de amido catiônico para a matéria seca da solução de lignina era 0,35 g/g.

[00184] Para ilustrar o efeito do amido catiônico na precipitação de soluções de deslignificação, na Figura 7 é mostrada uma fotografia dos tubos tirada após o tempo de reação de 8 horas. Ao contrário da ligeira diminuição da alcalinidade no Exemplo 8 depois de reações de 24 horas, nenhuma mudança no pH foi observada no exemplo atual.

[00185] A observação visual dos tubos mostrados na Figura 7 confirmou os resultados quantitativos da precipitação de lignina. Fica evidente a partir dos resultados mostrados nas Figuras 5 e 6 que o amido catiônico "Raifix 25035" precipitou até 80% do material absorvente de luz ultravioleta das soluções de deslignificação.

[00186] Os resultados indicam que o composto catiônico, tal como o

amido catiônico, pode ser usado para precipitar a lignina do líquido de deslignificação alcalina onde a alcalinidade é causada pelo composto de carbonato, tal como  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , sem ajuste do pH.

### **Exemplo 10**

[00187] A finalidade do exemplo era estudar o efeito da alcalinidade na precipitação de lignina pelo amido catiônico. Uma solução não alcalina foi obtida pela acidificação da solução de deslignificação de NaOH do Exemplo 6 pelo ácido sulfúrico 6 M a um pH 5. A fração líquida ("líquido não alcalino") foi separada dos sólidos precipitados por meio de centrifugação e filtração. 15 g do líquido (teor de matéria seca de 6,3%) foram tratados com o amido catiônico "Raifix 25035" tal como descrito acima no Exemplo 9, mas a uma dosagem diferente de amido catiônico. A diminuição na absorbância a 280 nm depois de uma incubação de 4 horas foi medida em relação à absorbância medida da solução de lignina não tratada. Os resultados apresentados na Figura 8 mostram que a diminuição na absorbância a 280 nm estava entre 8% e 24% quando a razão de dosagem entre o amido catiônico e a matéria dissolvida total estava entre 0,01 g/g e 0,07 g/g. Vale a pena anotar que o líquido não alcalino a um pH 5 continha uma grande proporção de sua matéria dissolvida como sais de sulfato. Para ilustrar ainda mais o efeito do amido catiônico no líquido não alcalino, na Figura 9 é mostrada uma fotografia dos tubos tirada depois de um tempo de reação de 14 horas.

[00188] Tal como indicado na Figura 8, um baixo grau de precipitação foi obtido do líquido não alcalino a um pH 5 quando suplementado com o amido catiônico "Raifix 25035". Desse modo, a presente invenção resulta em uma precipitação mais eficiente de lignina das soluções alcalinas em comparação à precipitação de lignina das soluções não alcalinas.

### **Exemplo 11**

[00189] Uma suspensão foi preparada ao misturar 100 kg de palha de trigo previamente limpa contendo uma umidade de 7% com 374 kg da solução de reciclagem de deslignificação alcalina com um teor de matéria seca de 6,4% e um pH de 12,8. A suspensão foi sujeitada ao tratamento de deslignificação a uma temperatura de 70°C e a um pH 12 por 2 horas. A fração sólida extraída foi separada da fração líquida por meio de filtração com pressão, e lavada com água. A palha extraída com NaOH tinha um teor de matéria seca de 35% e continha principalmente celulose e xilano.

[00190] A fração líquida (solução de deslignificação de NaOH) foi tratada com 1,2 kg de amido catiônico (Raifix 01035) que tem um teor de matéria seca de 40% para obter um material precipitado sólido que contém lignina e uma fração líquida alcalina. O material precipitado foi separado da fase líquida alcalina por meio de sedimentação e centrifugação e o líquido alcalino foi reciclado ao tratamento de deslignificação.

[00191] Este exemplo mostra que a lignina pode ser eficazmente separada do material lignocelulósico pré-tratado e que a lignina dissolvida pode ser recuperada da solução de deslignificação de NaOH por meio da floculação com um composto catiônico. O exemplo indica que o licor de deslignificação alcalina pode ser reciclado após a precipitação da lignina por composto catiônico e a remoção do precipitado.

### **Exemplo 12**

#### **Precipitação de lignina dissolvida em soluções alcalinas**

[00192] A palha de trigo foi moída com um triturador de martelos e uma porção de 2,445 kg foi imersa em 46,615 kg de água para formar uma massa total de 49,060 kg. Essa mistura foi tornada alcalina por 771 gramas de uma solução de NaOH a 50%. A suspensão foi aquecida em uma câmara de misturação de 200 l por 4 horas a 60°C com misturação a 100 rpm. A suspensão foi filtrada em seguida à mesma

temperatura. O sobrenadante alcalino, com um teor de matéria seca de 2,8%, foi tirado para tratamento subsequente.

[00193] O sobrenadante foi suplementado como amido catiônico (Raifix 25035) até a concentração de 5% (em peso/peso). A precipitação formada foi separada e em seguida a concentração do peso seco do sobrenadante era 2,5%.

[00194] Em um outro experimento, o sobrenadante que tem um teor de matéria seca de 2,8% foi suplementado com acetato de Ca ou  $\text{CaCl}_2$  até uma concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  de 2% tal como calculado por peso seco do sobrenadante. Após a separação do material precipitado, o teor de matéria seca foi determinado tal como mostrado nas Tabelas 2 e 3.

[00195] Ainda em um outro conjunto de experimentos, o sobrenadante alcalino com um teor inicial de matéria seca de 2,8% foi tratado primeiramente com amido catiônico tal como descrito acima e, depois da remoção do material precipitado, o sobrenadante foi tratado com sais de cálcio também tal como descrito acima. Os resultados são mostrados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Precipitação de lignina do sobrenadante alcalino por acetato de Ca e por tratamentos consecutivos, primeiramente com amido catiônico e em seguida com acetato de Ca.

<b>Amostra</b>	<b>Matéria seca no sobrenadante, %</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> adicionado, % da matéria seca do sobrenadante</b>	<b>Matéria seca do sobrenadante depois da remoção do precipitado, %</b>
Sobrenadante de lignina alcalino	2,73%	2,9%	3,1%
Sobrenadante de lignina alcalino	2,73%	5,8%	2,65%
Sobrenadante de lignina alcalino após o tratamento de amido catiônico	2,84%	5,6%	2,73%

Tabela 3. Precipitação de lignina do sobrenadante alcalino por acetato

de Ca e por tratamentos consecutivos, primeiramente com amido catiônico e em seguida com acetato de Ca.

Amostra	Matéria seca no sobrenadante, %	Ca <sup>2+</sup> adicionado, % da matéria seca do sobrenadante	Matéria seca do sobrenadante depois da remoção do precipitado, %
Sobrenadante de lignina alcalino	2,73	2,4	2,77
Sobrenadante de lignina alcalino após o tratamento de amido catiônico	2,84	2,5	2,45

[00196] O exemplo mostra que a lignina pode ser removida das soluções alcalinas por meio de precipitação, o que permite o uso de sobrenadante deslignificado como uma fonte de álcali no tratamento de lignocelulose.

### **Exemplos de hidrólise enzimática de palha auto-hidrolisada e/ou deslignificada**

#### **Exemplo 13**

[00197] Uma comparação da palha deslignificada com NaOH (o material do Exemplo 6) e da palha auto-hidrolisada (o material do Exemplo 1) foi executada em três processos diferentes de hidrólise de enzima, incluindo a hidrólise descontínua, a hidrólise sequencial e a reciclagem de sólidos a uma alimentação de processo constante. Uma mistura de enzimas foi usada, a qual compreende 85% de celulase (Econase CE, Roal Oy), 10% de celobiase (Novozyme 188, Sigma /Novozymes) e 5% de xilanase (GC140, Genencor). As reações foram executadas a um pH 5 e à temperatura de 50°C em um agitador a 200 rpm.

#### **Hidrólise descontínua**

[00198] Uma hidrólise descontínua foi executada para a palha deslignificada com NaOH e a palha auto-hidrolisada a uma consistência de 10% e uma consistência de 8% (onde a "consistência" era a pro-

porção de sólidos insolúveis na pasta de reação, em peso/peso). Foi usada uma dose de enzima que continha uma atividade de enzima de 9 FPU/g de DM da palha pré-tratada. Os rendimentos de açúcar (os açúcares anidros liberados como porcentagem do total de carboidratos poliméricos no material) são mostrados na Figura 10. Depois de 24 horas, 48 horas e 72 horas de hidrólise, os rendimentos de açúcar da palha deslignificada com NaOH a uma consistência de 8% e de 10% foram em média de 50%, 65% e 74%, ao passo que, com a palha auto-hidrolisada, os rendimentos a 8% e a uma consistência de 10% foram uma média de 49%, de 56% e 59%, respectivamente, mostrando que um rendimento maior de açúcar pode ser obtido da palha deslignificada com NaOH com a mesma quantidade de enzima do que no caso da palha auto-hidrolisada. Os rendimentos foram normalmente ligeiramente maiores à consistência mais baixa.

[00199] A produtividade volumétrica mostrada na Figura 12 da hidrólise descontínua de 48 horas e 72 horas da palha deslignificada com NaOH era de 1,32 g/l/h (gramas de açúcar por litro da pasta da reação por hora) e de 0,82 g/l/h, respectivamente, que eram consideravelmente mais elevadas em comparação com as produtividades volumétricas de 0,74 g/l/h e de 0,42 g/l/h, respectivamente, obtidas da palha auto-hidrolisada.

[00200] A produtividade da enzima (kg de açúcar obtido com um litro de enzima) das reações é mostrada na Figura 11. A produtividade da enzima na hidrólise descontínua de 72 horas da palha deslignificada com NaOH era de 4,2 kg/l de enzima, que era quase o dobro em comparação à produtividade de enzima de 2,2 kg/l com a palha auto-hidrolisada.

[00201] Este exemplo indica que um rendimento de açúcar, uma produtividade de enzima e uma produtividade volumétrica maiores foram obtidos da palha deslignificada em comparação àquelas da palha

auto-hidrolisada em uma hidrólise enzimática descontínua.

### **Hidrólise sequencial**

[00202] A palha deslignificada com NaOH e a palha auto-hidrolisada foram hidrolisadas por uma hidrólise de três etapas que consistia em três reações sequenciais de 24 horas. Entre as reações, o líquido foi separado dos sólidos e o resíduo sólido foi misturado com o líquido fresco e as enzimas. A proporção dos sólidos no processo total ("a consistência total" ou "a consistência de alimentação") era de 10% nas duas primeiras reações e de 8% nas três reações. Devido ao fato que a quantidade total de líquido foi dividida entre as reações, a consistência real da primeira, segunda e terceira reações era de 14,3%, 12,5% e 10,6% com a palha deslignificada com NaOH e de 14,4%, 12,9% e 12,8% com a palha auto-hidrolisada, respectivamente. O coquetel e a dose de enzima similares foram usados, tal como descrito em "hidrólise descontínua da palha deslignificada com NaOH". Dois terços (66,6%) da dose total de enzima foram aplicados na primeira reação e um terço (33,3%) na segunda reação.

[00203] O rendimento de açúcar (os açúcares anidros liberados como porcentagem do total de carboidratos poliméricos no material, Figura 10) depois da primeira, segunda e terceira reações era de 35%, 57% e 70%, respectivamente, da palha deslignificada com NaOH e de 36%, 55% e 65%, respectivamente, da palha auto-hidrolisada. Embora o rendimento fosse ligeiramente maior da palha auto-hidrolisada após a primeira reação, o rendimento da palha deslignificada com NaOH prevaleceu claramente depois da segunda e terceira reações. A produtividade volumétrica total (Figura 12) depois de duas e três reações sequenciais de 24 horas eram de 1,74 g/l/h e 1,61 g/l/h, respectivamente, com a palha deslignificada com NaOH, que era consideravelmente maior em comparação às produtividades de 1,10 g/l/h e de 0,94 g/l/h, respectivamente, da palha auto-hidrolisada. A produtividade da

enzima depois de três reações de 24 horas com a palha deslignificada com NaOH era de 4,4 kg/l de enzima, que era drasticamente mais elevada em comparação à produtividade de 2,4 kg/l de enzima com a palha auto-hidrolisada (Figura 11).

[00204] Este exemplo indica que um rendimento de açúcar, uma produtividade de enzima e uma produtividade volumétrica maiores foram obtidos da palha deslignificada em comparação àqueles da palha auto-hidrolisada em uma hidrólise enzimática sequencial.

### **Hidrólise com reciclagem de sólidos**

[00205] A palha deslignificada com NaOH e a palha auto-hidrolisada foram hidrolisadas em um processo de reciclagem de sólidos. Múltiplas reações subsequentes foram realizadas, onde a palha pré-tratada fresca, a enzima e o líquido foram misturados a uma consistência de 10%. Na mistura de constituintes frescos da reação, 50% de resíduo sólido separado da reação precedente foram misturados. A reciclagem do resíduo sólido conduziu a um aumento na consistência real da reação, que foi aumentada para 12,3% com a palha deslignificada com NaOH e para 13,2% com a palha auto-hidrolisada. Seis reações de reciclagem subsequentes foram realizadas a fim de atingir um estado estável, onde o volume da reação, a consistência e o rendimento da hidrólise permaneceram constantes entre as reações subsequentes. Quando o estado estável foi alcançado, a parte do resíduo sólido que não reciclada foi misturada com uma quantidade constante de líquido fresco e uma reação de 24 horas adicionais foi realizada, a uma consistência de 10,5% com a palha deslignificada com NaOH e de 13,1% com a palha auto-hidrolisada. A proporção total dos sólidos (ou "a consistência total" ou "a consistência de alimentação") era de 10% na reação de reciclagem apenas e 8% de no processo incluindo a reação de reciclagem e a reação adicional.

[00206] O rendimento do açúcar como açúcares anidros liberados

como porcentagem do total de carboidratos poliméricos no material, Figura 10, na reação inicial que não continha nenhum material reciclado era de 51% e 50% para a palha deslignificada com NaOH e a palha auto-hidrolisada, respectivamente. Depois de seis reações subsequentes com reciclagem de 50% do resíduo sólido, o rendimento da hidrólise foi aumentado para 57% e para 55% com a palha deslignificada com NaOH e a palha auto-hidrolisada, respectivamente. Após a reação adicional, o rendimento total do açúcar era de 69% e 65% com a palha deslignificada com NaOH e a palha auto-hidrolisada, respectivamente, mostrando desse modo rendimentos normalmente maiores para a palha deslignificada com NaOH. A produtividade volumétrica da reação de reciclagem apenas com a palha deslignificada com NaOH e a palha auto-hidrolisada era de 1,99 g/l/h e 1,17 g/l/h, respectivamente e, incluindo a reação adicional, de 1,77 g/l/h e 0,99 g/l/h, respectivamente, exibindo produtividades volumétricas consideravelmente maiores com a palha deslignificada com NaOH. A produtividade da enzima da reação de reciclagem apenas com a palha deslignificada com NaOH e a palha auto-hidrolisada era de 3,2 kg/l e 2,0 kg/l, respectivamente e, quando a reação adicional foi incluída, de 3,8 kg/l e 2,4 kg/l, respectivamente, exibindo uma produtividade de enzima drasticamente maior para a palha deslignificada com NaOH em comparação com aquela da palha auto-hidrolisada.

[00207] A progressão da hidrólise nas reações subsequentes é apresentada na Figura 13a. A progressão do volume da reação é apresentada na Figura 13b. A progressão da consistência da reação é apresentada na Figura 13c.

[00208] Este exemplo indica que um rendimento de açúcar, uma produtividade de enzima e uma produtividade volumétrica maiores foram obtidos da palha deslignificada em comparação com a palha auto-hidrolisada no processo de hidrólise enzimática com a reciclagem de

sólidos.

### **Conclusões do Exemplo 13**

1. O rendimento total do açúcar era geralmente maior para a palha deslignificada com NaOH em comparação à palha auto-hidrolisada em todos os processos diferentes.

2. Uma vez que a produtividade volumétrica foi maior com a palha deslignificada com NaOH em comparação com a palha auto-hidrolisada em todos os processos diferentes, reatores e separadores menores são requeridos para uma determinada taxa de produção de açúcar na hidrólise da palha deslignificada com NaOH em comparação com a palha auto-hidrolisada.

3. Uma vez que a produtividade enzimática foi maior com a palha deslignificada com NaOH em comparação com a palha auto-hidrolisada em todos os processos diferentes, o custo da enzima por kg de açúcar obtido é mais baixo com a palha deslignificada com NaOH do que com a palha auto-hidrolisada.

4. Quantidades iguais de água por palha pré-tratada foram usadas neste exemplo. Pode ser concluído que a reciclagem de sólidos e a hidrólise sequencial conduziram a rendimentos da hidrólise iguais, mas aumentaram as produtividades volumétricas em comparação à hidrólise descontínua.

### **Exemplo 14**

Preparação de hidrolisados

Líquido C de auto-hidrólise

[00209] A reação de auto-hidrólise para a palha de trigo e o isolamento subsequente de oligossacarídeos de hemicelulose foi realizada para produzir a fração líquida para a fermentação, e a fração sólida suscetível para a hidrólise enzimática. Para conseguir isso, 35,7 kg de palha de trigo (teor de da matéria seca de 89,8%) foram misturados com 240 kg de água, obtendo uma suspensão a uma consistência de

11,6% em um reator de tanque agitado de 500 dm<sup>3</sup>. A suspensão foi aquecida até 180°C e em seguida resfriada até menos de 100°C. A suspensão hidrotermicamente tratada foi descarregada do reator e a primeira fração líquida separada da fração sólida ao usar uma centrífuga de decantador. A fração sólida foi lavada em suspensão em água ácida ajustada a um pH 4 com ácido fosfórico. A fração sólida foi separada da segunda fração líquida na centrífuga do decantador. A primeira e a segunda frações líquidas foram combinadas e concentradas em um evaporador de película de queda para obter 18,3 kg do líquido de auto-hidrólise concentrado formando o líquido C de auto-hidrólise contendo açúcares de hemicelulose parcialmente na forma oligomérica e com um teor de matéria seca de 42% e substância seca refratométrica de 38 Bx°. A fração sólida lavada (96,7 kg com um teor de matéria seca de 23,0%) foi usada como material de alimentação para a hidrólise enzimática para produzir o hidrolisado de celulose para o cultivo.

[00210] Uma parte dos compostos fenólicos do concentrado líquido de auto-hidrólise contido foi removida ao tratar o líquido mediante a adição de 40 g/l de carbono ativado, misturando suavemente por 20 horas a 4°C e finalmente separando o carbono por meio de filtração ao usar um pano de filtração de 400 µm.

[00211] O hidrolisado enzimático da fração de celulose da palha de trigo foi preparado a partir da fração sólida contendo celulose (após a lavagem) do experimento de auto-hidrólise onde o líquido C de auto-hidrólise foi preparado. A fração sólida lavada do tratamento de auto-hidrólise que forma o líquido C de auto-hidrólise (17,3 kg com um teor de matéria seca de 23,1%) foi colocada em um reator de tanque de agitação de 40 dm<sup>3</sup> e misturada com 14,7 kg de água e 10 ml de NaOH a 50% (em peso/peso) para obter a suspensão a uma consistência de 12,5% e a um pH 5. O reator foi aquecido e mantido a 50°C e 216 ml da mistura de enzima que compreende 82% de celulose (Econase

CE, Roal Oy), 10% de celobiase (Novozyme 188, Sigma/Novozymes) e 7% de xilanase (GC140, Genencor). Durante o tratamento enzimático, a suspensão foi agitada periodicamente três vezes por hora por 5 minutos. Depois de um tempo de residência de 48 horas, a suspensão foi suplementada com a mistura fresca, somando 10% da dosagem de enzima inicial e com proporções similares de enzimas individuais. Após o tempo de residência de 72 horas a 50°C, a fração líquida foi separada da fração sólida por meio de filtração ao usar a hidroprensagem. A fração sólida foi lavada uma vez com água e a fração líquida foi separada outra vez da fração sólida. As frações líquidas foram combinadas e concentradas por meio de evaporação sob pressão reduzida. O concentrado de hidrolisado celulósico (1,57 kg) continha um total de açúcar de 220 g/l.

[00212] O hidrolisado de celulose contendo açúcares monoméricos foi usado como tal no cultivo.

#### **Produção de óleo de uma só célula**

[00213] Os experimentos foram realizados ao usar uma cepa de fundo *Aspergillus oryzae* produtora de lipídeo. Do fungo de esporulação cultivado em pratos PDA, uma suspensão de esporos foi produzida ao adicionar 12 ml de água estéril, e os esporos foram raspados com um laço de inoculação no líquido. 24 ml da suspensão de esporos foram usados diretamente para a inoculação do fermentador. A composição do meio é apresentada na Tabela 4. O líquido C d auto-hidrólise purificado (solução de hemicelulose, açúcares hemicelulósicos) e o hidrolisado de celulose do mesmo experimento foram usados no cultivo. O cultivo foi feito em um fermentador Biostat B plus de 5 l em um volume de 3 l, e durante o mesmo a agitação foi ajustada a 500 rpm, o pH foi mantido em 5,5 com NaOH 3 M, a aeração era de 1 vvm e uma temperatura de 35°C durante o crescimento, na produção de lipídeo ela foi reduzida para 28°C.

**Tabela 4:** Composição do meio de crescimento

<b>Componentes do meio</b>	<b>Concentração (g/l)</b>
Açúcares hemicelulósicos	20
Extrato de amido	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,3

[00214] Depois da inoculação, passaram cerca de 30 horas antes que o fungo começasse a crescer ativamente. Durante o cultivo, a solução de hemicelulose foi adicionada em pequenas bateladas e, depois de 95 horas do cultivo, as cargas foram mudadas para o hidrolisado celulósico. Durante o cultivo, no total 236 g de hemicelulose e 484 g de hidrolisado de celulose foram adicionados. Uma parte dos açúcares adicionados foi deixada não utilizada no final da fermentação. Em 167 horas, quando o cultivo terminou, havia 16 g/l de biomassa, da qual 43% consistiam em lipídeos (Figura 14). Pode ser concluído que a produção de óleo microbiano a partir de hemicelulose de palha de trigo e de açúcares de celulose foi bem sucedida.

### **Exemplo 15 - Produzindo de óleo microbiano em açúcares hemicelulósicos**

Preparação do hidrolisado, líquido C de auto-hidrólise

[00215] Uma suspensão foi preparada ao misturar 10,5 kg de palha de trigo moída (teor de matéria seca de 92,7%) e 54,1 kg de água da torneira em um recipiente de 100 dm<sup>3</sup>. Depois de uma armazenagem à temperatura ambiente por 18 horas, 64,2 kg da suspensão foram colocados em um reator de autoclave agitado de 250 dm<sup>3</sup> cilíndrico horizontal. O reator foi fechado e aquecido dentro de 75 minutos até 140°C, mantido a 140°C por 5 horas e resfriado até a temperatura am-

biente dentro de 30 minutos. A suspensão hidrotermicamente tratada foi descarregada manualmente do reator, e a primeira fração líquida foi separada do primeiro sólido por meio de filtração. A primeira fração sólida foi lavada duas vezes com água da torneira e prensada ao usar uma hidroprensa, obtendo a fração sólida lavada. A fração sólida lavada (20,9 kg) tinha um teor de matéria seca de 42,7%. A primeira fração líquida foi combinada com a água de lavagem e concentrada em um evaporador de película de queda até um teor de 11,5% (em peso/peso) de matéria seca. O líquido C de auto-hidrólise concentrado continha um total de açúcar de 49,3% da matéria seca total do líquido concentrado tal como determinado após a hidrólise de ácido diluído (ácido sulfúrico a 4% em peso/peso, 121/C, 1 hora) por meio de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). As proporções relativas de xilose anidra, arabinose anidra, glicose anidra e galactose anidra do teor total de açúcar eram de 57%, 19%, 13% e 11%, respectivamente.

[00216] Em seguida, os açúcares hemicelulósicos contendo o líquido C de auto-hidrólise na forma oligomérica foram usados parcialmente nos experimentos de cultivo como tais sem purificação.

#### **Produção de óleo de uma só célula**

[00217] Os experimentos foram feitos ao usar uma cepa de fungo de *A. orizae* produtora de lipídeo. A partir do fungo de esporulação cultivado em pratos PDA, uma suspensão de esporos foi produzida ao adicionar 12 ml de água estéril e os esporos foram raspados com um laço de inoculação no líquido. 24 ml da suspensão de esporos foram usados para um inoculação de 6 frascos. A composição do meio é apresentada na Tabela 5. Os frascos inoculados foram incubados a 30°C com uma agitação a 160 rpm por 1 dia, e foram usados então para a inoculação do fermentador.

**Tabela 5:** Composição do meio de inoculação, pH ajustado em 5,5.

<b>Componentes do meio</b>	<b>Concentração (g/l)</b>
Açúcares hemicelulósicos	40
Extrato de amido	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,2

[00218] O líquido D de auto-hidrólise (que contém açúcares hemicelulósicos parcialmente na forma oligomérica) foi usado e continha 4,2 g/l de compostos fenólicos com base na análise com o método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). O cultivo foi feito em um fermentador Biostat B plus de 5 l em um volume de 3 l, e durante a agitação foi ajustado a 400 rpm, o pH foi mantido em 5,5 com NaOH 3 M, a aeração era de 1 vvm e a temperatura 30°C. A composição do meio é apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6:** A composição do meio de fermentação

<b>Componentes do meio</b>	<b>Concentração (g/l)</b>
Açúcares hemicelulósicos	60
Extrato de amido	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
MgCl*6H <sub>2</sub> O	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,2

Resultados:

[00219] Durante o cultivo, a solução hemicelulósica foi adicionada em pequenas bateladas. No total, 150 g de hemicelulose foram adicionados. Uma parte dos açúcares adicionados foi deixada não utilizada no final da fermentação. Em 142 horas, quando o cultivo terminou, ha-

via 14 g/l de biomassa, da qual 21% consistiam em lipídeos. Pode ser concluído que a produção de óleo microbiano a partir de açúcares hemicelulósicos do trigo (parcialmente na forma oligomérica) foi bem sucedida. A produção de óleo microbiano a partir de açúcares hemicelulósicos foi bem sucedida sem a purificação do hidrolisado (com exceção da evaporação usada na concentração dos açúcares). Na fermentação, a concentração de compostos fenólicos era de 2,8 g/l.

[00220] Portanto, também pode ser afirmado que o crescimento de fungos e a produção de lipídeo eram possíveis apesar das concentrações elevadas de inibidor.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para o fracionamento de um material lignocelulósico, o método caracterizado pelo fato de que compreende

a) a sujeição do material lignocelulósico a um tratamento de deslignificação na presença de um agente de deslignificação alcalina para produzir uma mistura que compreende uma primeira fase sólida e uma primeira fase líquida que contém lignina dissolvida, em que o agente de deslignificação alcalina é adicionado ao material lignocelulósico para obter uma suspensão que tem um pH acima de 7,

b) a separação da primeira fase sólida da primeira fase líquida,

c) a introdução de um composto catiônico na primeira fase líquida para produzir uma mistura que compreende uma segunda fase sólida e uma segunda fase líquida, e em que a segunda fase líquida é separada da segunda fase sólida e a segunda fase líquida é reciclada para a etapa a),

d) a sujeição da primeira fase sólida a um tratamento de hidrólise enzimática na presença de enzimas que podem hidrolisar as frações de hemicelulose e de celulose da primeira fase sólida para produzir uma mistura que compreende a terceira fase líquida na forma de um hidrolisado enzimático e uma terceira fase sólida,

e) a separação da terceira fase líquida da terceira fase sólida, e em que o composto catiônico é selecionado de um grupo que compreende polímeros e oligômeros catiônicos tais como polissacarídeos de amido catiônicos, amilose catiônica, amilopectina catiônica, dextrana catiônica, oligômeros de lignina catiônicos, polímeros de lignina catiônicos, turfa catiônica, ou as misturas destes, ou em que o composto catiônico é um íon catiônico elemental selecionado do grupo que compreende metais alcalinos terrosos e cátions bivalentes e trivalentes de ferro (Fe) ou alumínio (Al) derivados de compostos tais como

cloreto de alumínio  $\text{Al}_2\text{Cl}_3$ , acetato de bário  $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ , bicarbonato de bário  $\text{Ba}(\text{HCO}_3)_2$ , brometo de bário  $\text{BaBr}_2$ , cloreto de bário  $\text{BaCl}_2$ , formato de bário  $\text{Ba}(\text{HCO}_2)_2$ , hidróxido de bário  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , nitrato de bário  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ , acetato de cálcio  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ , bicarbonato de cálcio  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ , brometo de cálcio  $\text{CaBr}_2$ , cloreto de cálcio  $\text{CaCl}_2$ , formato de cálcio  $\text{Ca}(\text{HCO}_2)_2$ , hidróxido de cálcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , nitrato de cálcio  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , acetato de magnésio  $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ , bicarbonato de magnésio  $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ , brometo de magnésio  $\text{MgBr}_2$ , cloreto de magnésio  $\text{MgCl}_2$ , formato de magnésio  $\text{Mg}(\text{HCO}_2)_2$ , hidróxido de magnésio  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , nitrato de magnésio  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , acetato de ferro  $\text{Fe}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ , cloreto férrico  $\text{FeCl}_3$ , e os hidratos correspondentes.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os polímeros e os oligômeros catiônicos têm uma densidade de carga catiônica de 0,5 a 5 meq/g.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a quantidade de composto catiônico é de 0,001 a 0,25 g/g com base no teor de matéria seca da primeira fase líquida.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o agente de deslignificação alcalina é selecionado de um grupo que consiste em hidróxido de sódio, carbonato de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, hidróxido de cálcio e carbonato de cálcio, hidróxido de lítio, carbonato de lítio, hidróxido de amônio, amônia, sulfeto de sódio, e os hidratos correspondentes.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a concentração do agente de deslignificação é de 0,1 a 10% em peso, com mais preferência de 0,1 a 4% em peso com base na quantidade de material lignocelulósico na base de matéria seca.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 5, caracterizado pelo fato de que o agente de deslignificação alcalina é adicionado ao material lignocelulósico para obter uma suspensão que tem um pH entre 10 e 13.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o material lignocelulósico é sujeito a um tratamento no qual a hemicelulose é removida pelo menos parcialmente do material lignocelulósico como um hidrolisado de hemicelulose aquoso, antes que o material lignocelulósico seja sujeito à etapa a).

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a hemicelulose é pelo menos parcialmente removida do material lignocelulósico pelo tratamento hidrotérmico.

FIG. 1

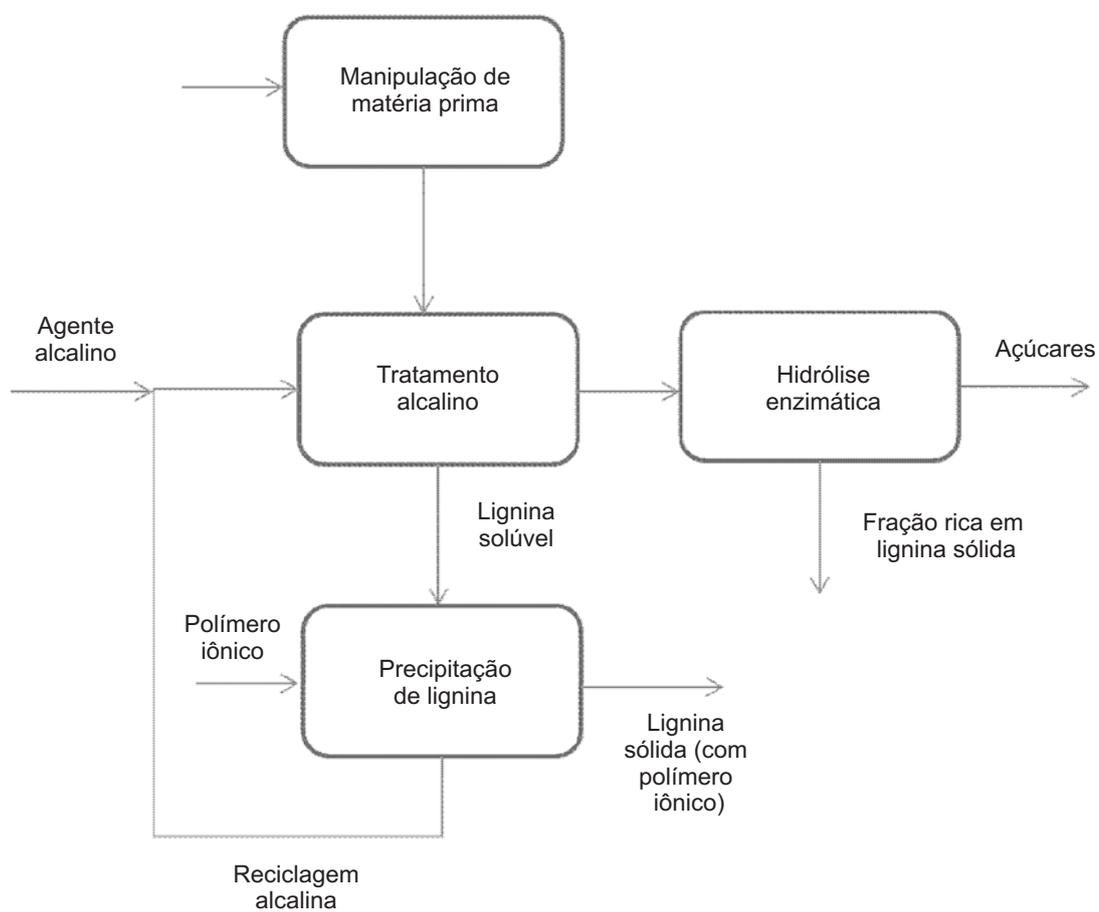


FIG. 2

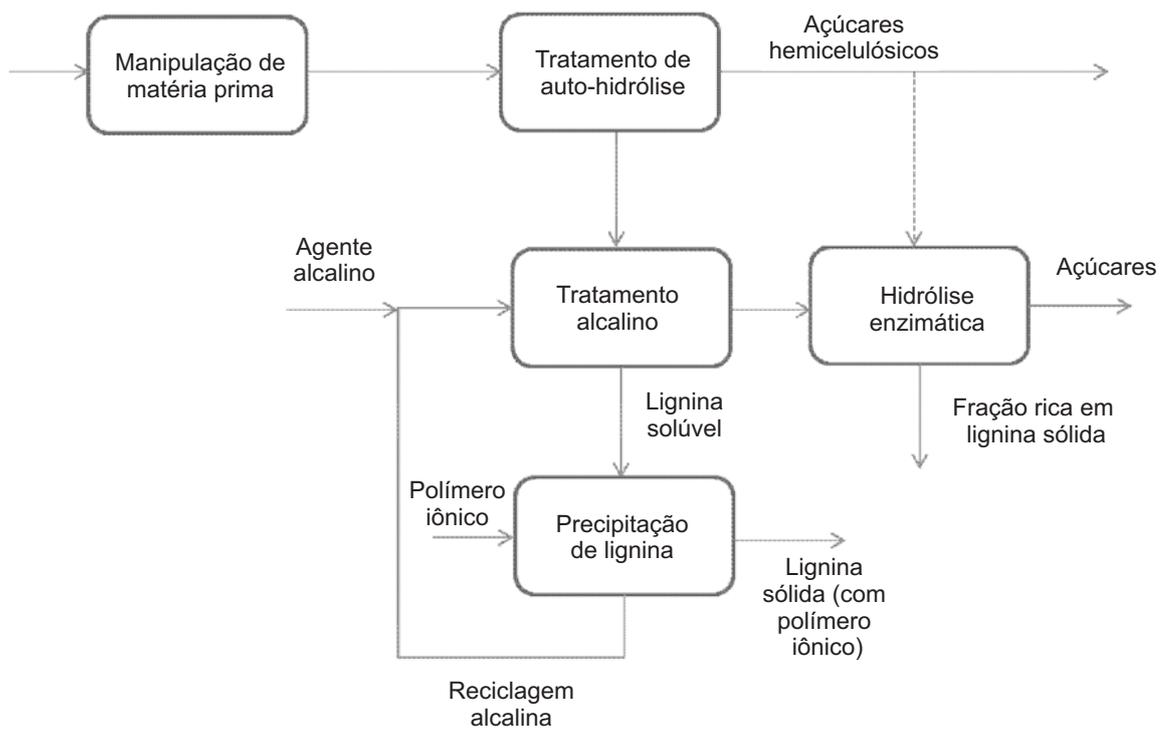


FIG. 3

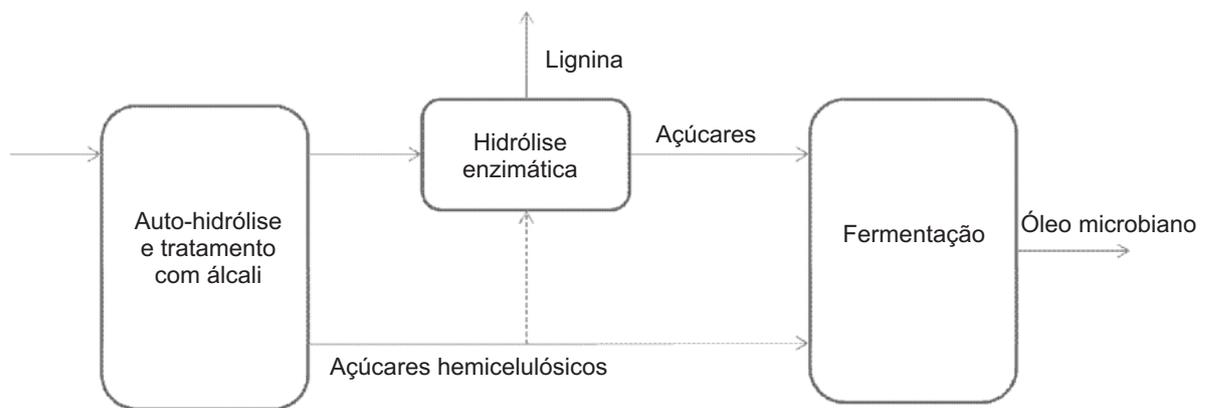


FIG. 4

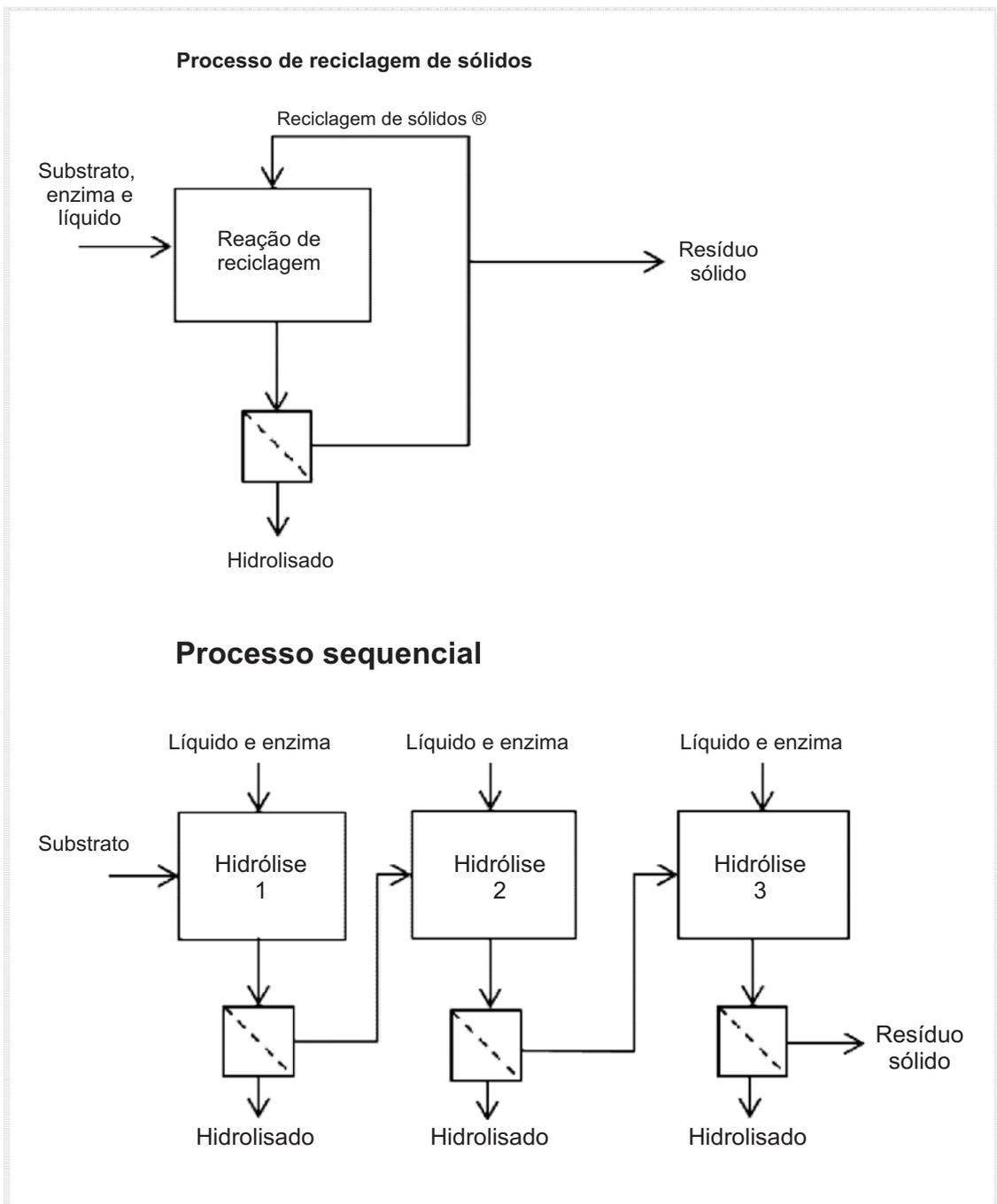


FIG. 5

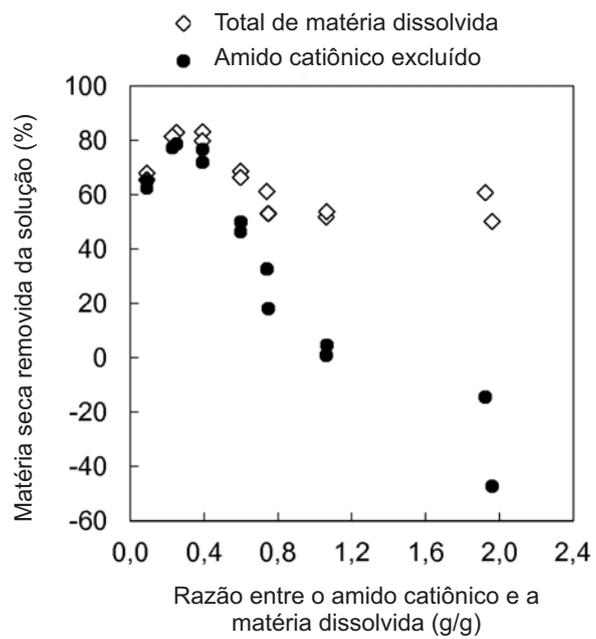
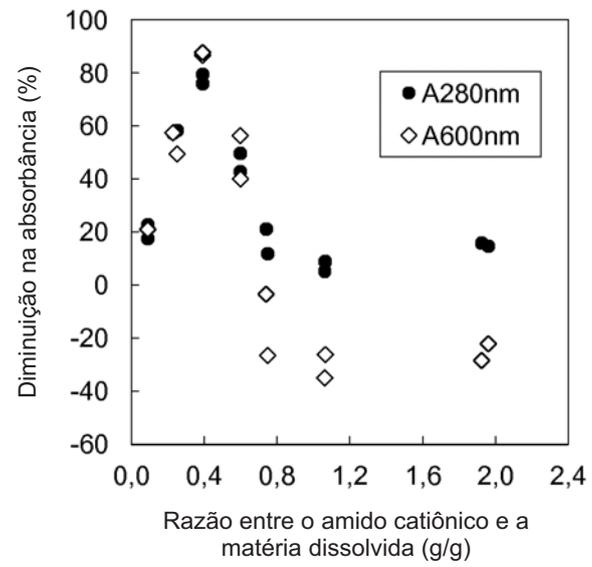


FIG. 6

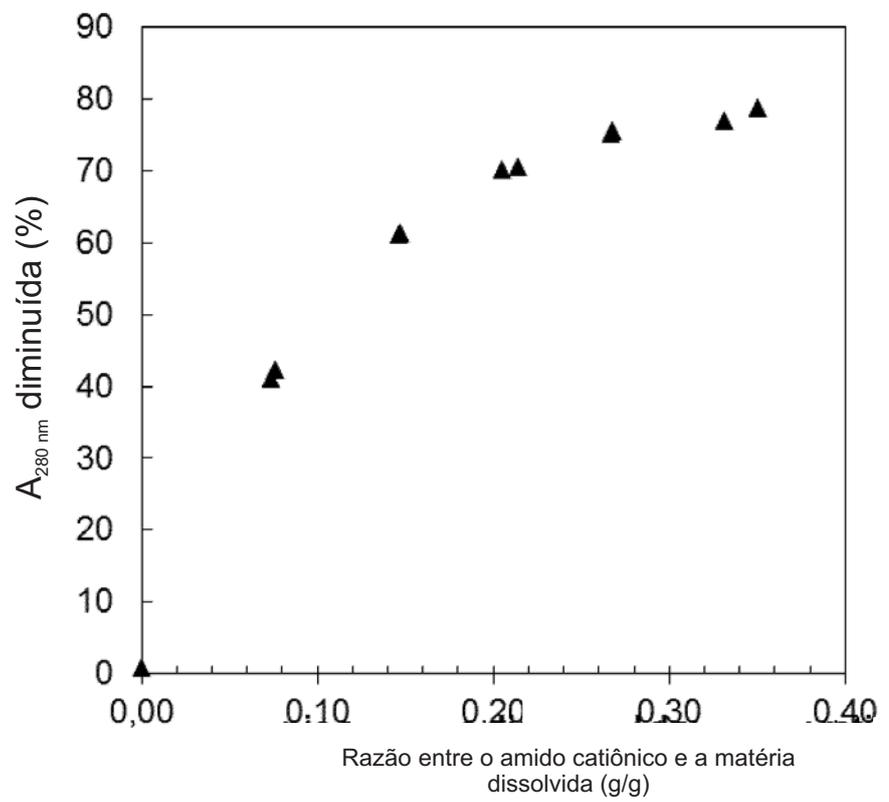


FIG. 7

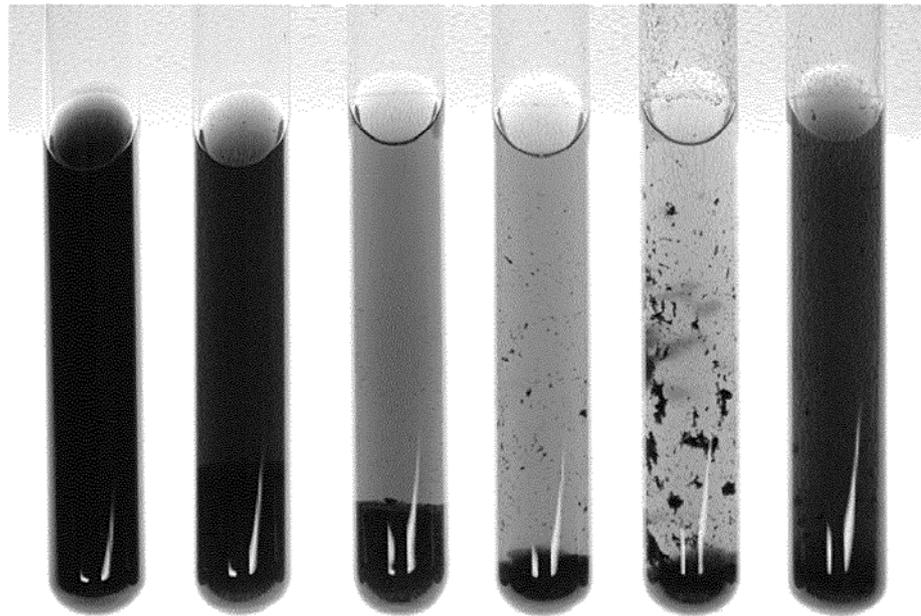


FIG. 8

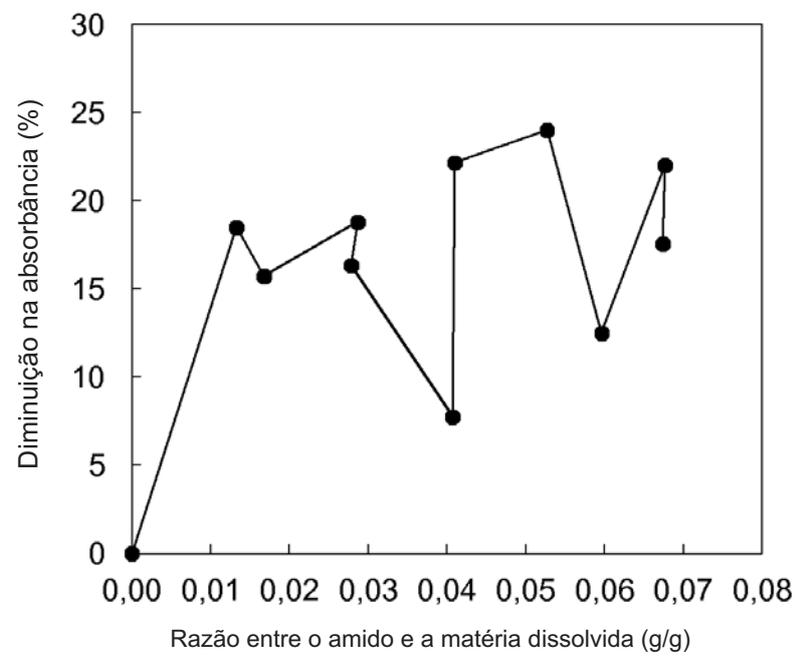


FIG. 9

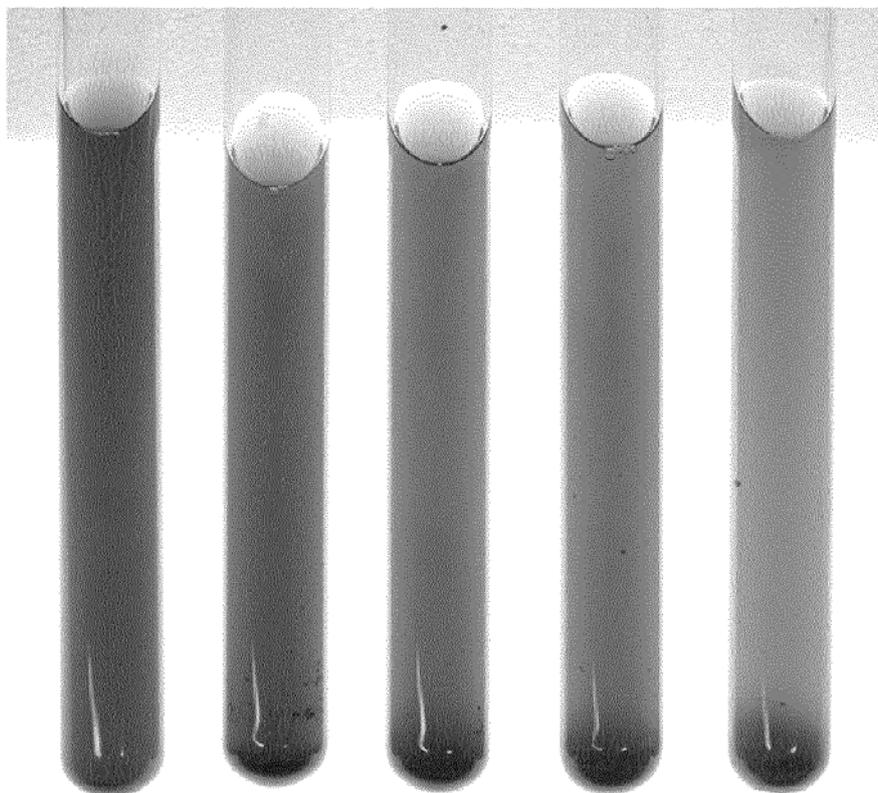


FIG. 10

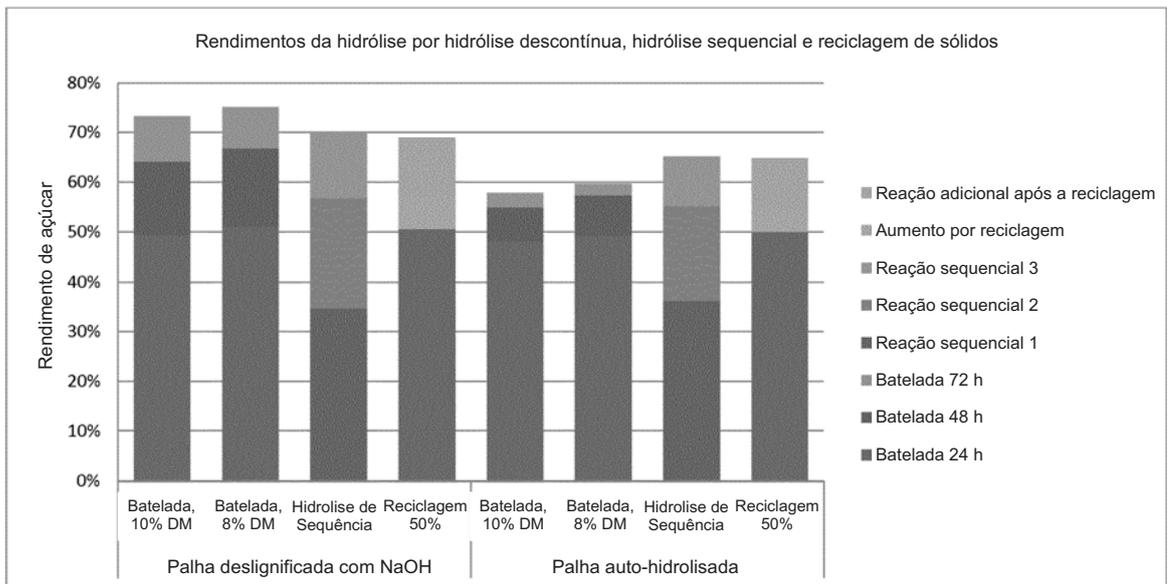


FIG. 11

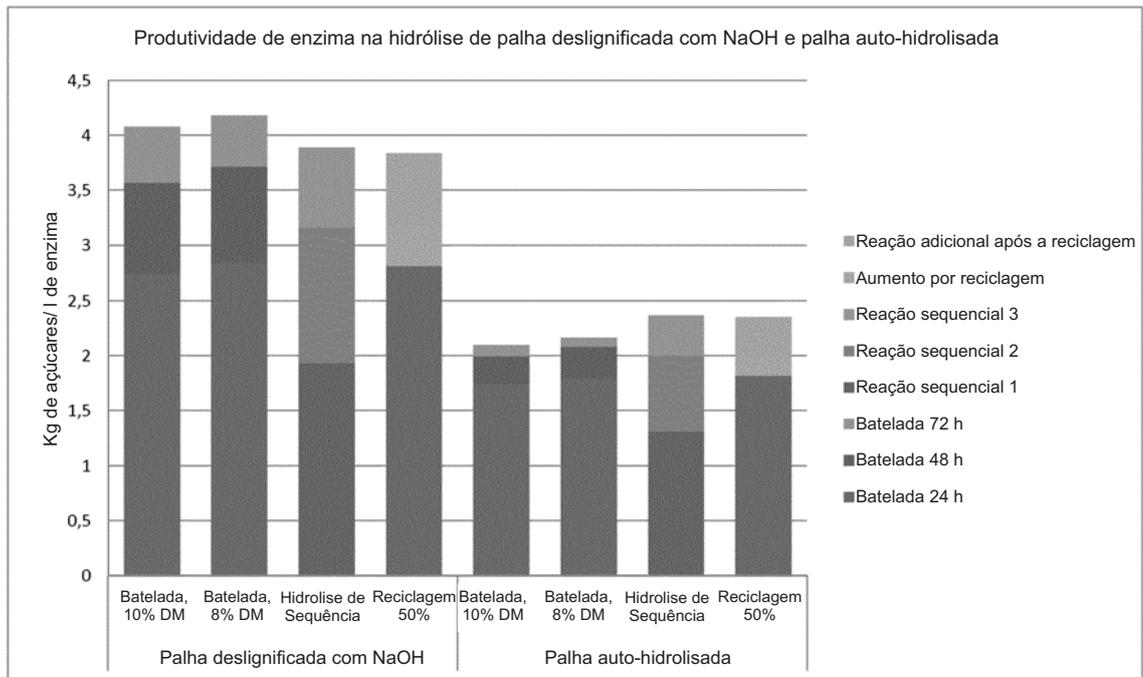


FIG. 12

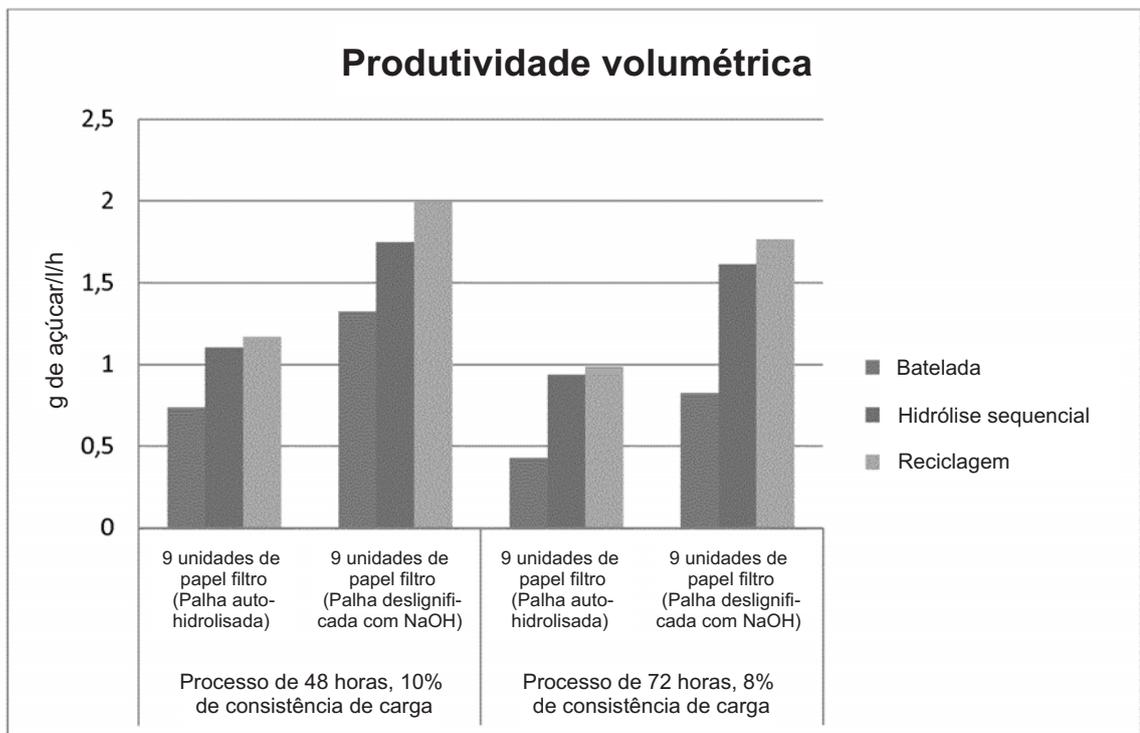


FIG. 13

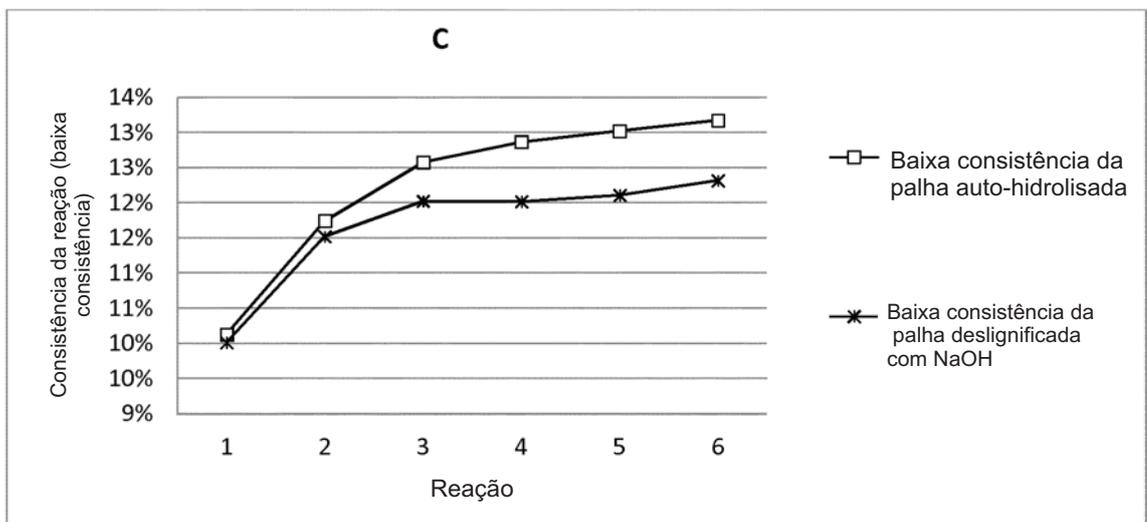
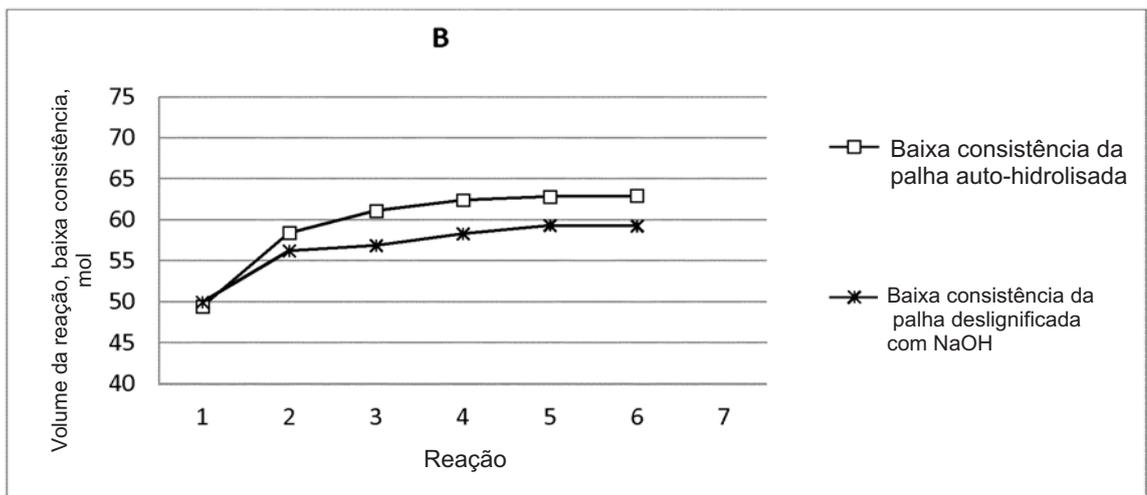
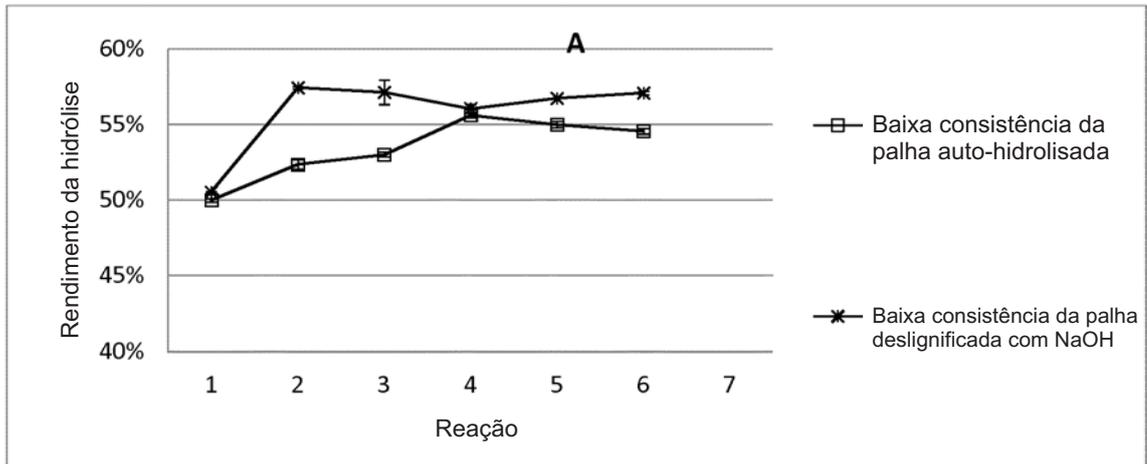


FIG. 14

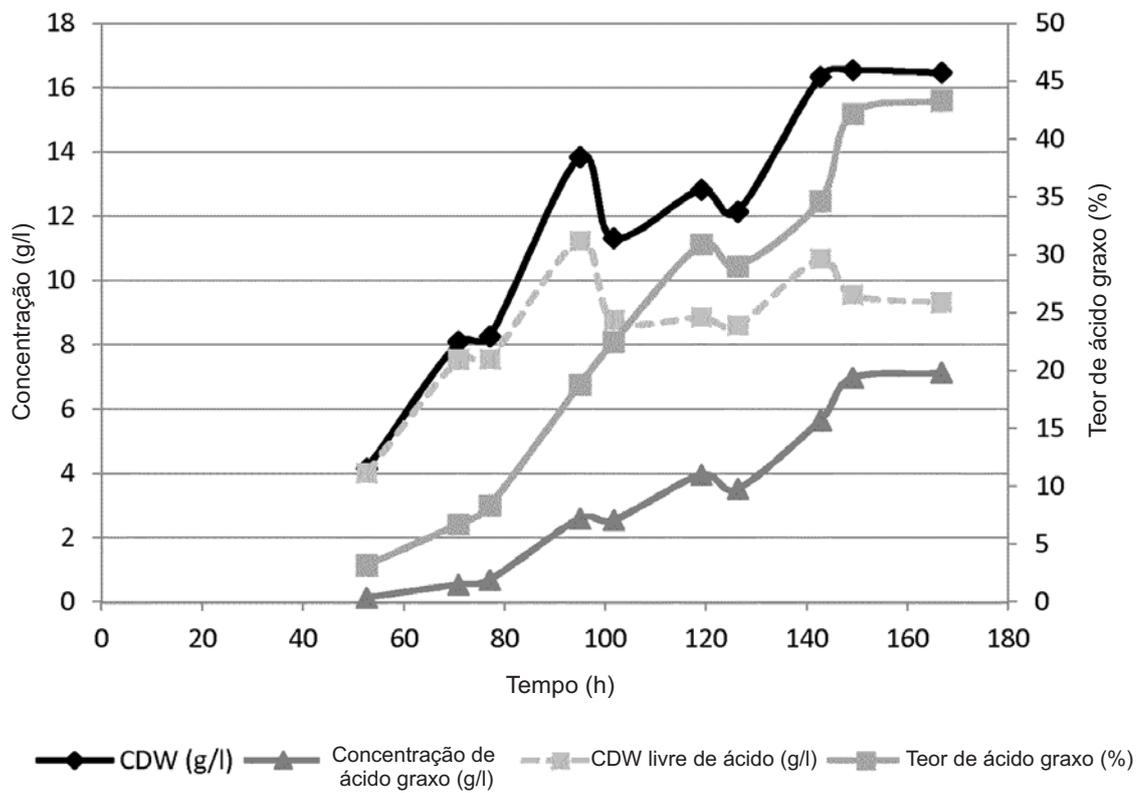


FIG. 15

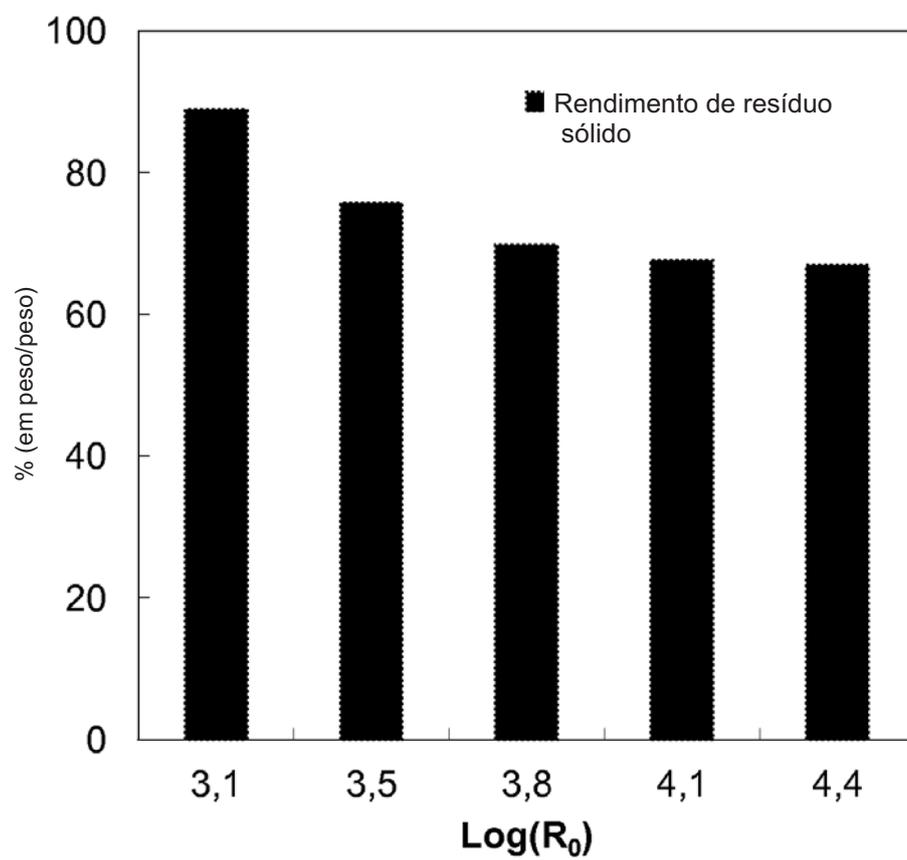


FIG. 16

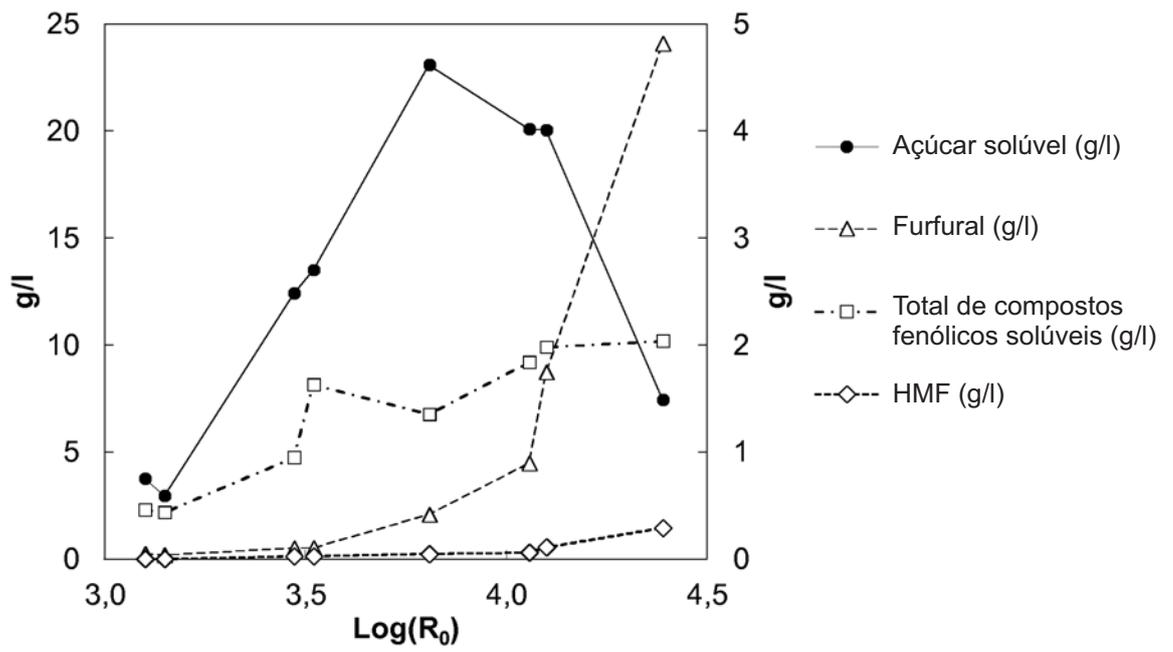


Tabela 1

Treatmento de designificação	Qtde de agente químico alcalino <sup>a</sup>	pH antes do tratamento <sup>b</sup>	pH após o tratamento <sup>c</sup>	Rendimento de DM <sup>d</sup>	Rendimento de açúcar monomérico com base no DM <sup>e</sup> de palha designificada	Rendimento de açúcar monomérico com base na (%) <sup>f</sup> de DM de palha auto-hidrolisada	Rendimento de açúcar monomérico com base na (%) <sup>g</sup> de carboidratos de palha auto-hidrolisada
Solução de NaOH + 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,3	10,2	8,5	77	0,48	37,0	63,1
Ca(OH) <sub>2</sub>	Solução saturada a 3%	10,30	9,3	91	0,41	37,3	63,7
Solução de Ca(OH) <sub>2</sub> + 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Solução saturada a 3%	9,30	7,8	91	0,42	38,2	65,2
NaOH	0,85	10,0	8,8	89	0,44	39,5	67,4
Palha auto-hidrolisada sem designificação	0	5,2	5,3	100	0,36	36,0	61,4

<sup>a</sup> % de palha auto-hidrolisada na base de matéria seca

<sup>b</sup> pH do licor antes do aquecimento

<sup>c</sup> pH do licor após o aquecimento e a filtração dos sólidos

<sup>d</sup> % de matéria seca restante após o tratamento de designificação

<sup>e</sup> razão entre os açúcares monoméricos obtidos da hidrólise enzimática e a matéria seca de palha designificada com base em g/g

<sup>f</sup> razão entre os açúcares obtidos a partir da hidrólise enzimática e a matéria seca de palha

<sup>g</sup> calculado como a razão entre a quantidade total de monossacarídeos liberados na hidrólise enzimática e a quantidade total de monossacarídeos liberados de um peso similar da palha auto-hidrolisada na hidrólise ácida multiplicado pelo rendimento de matéria seca do tratamento de designificação