



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

(11) PI 0318199-5 B1



(22) Data de Depósito: 09/12/2003

(45) Data da Concessão: 15/09/2015
(RPI 2332)

(54) Título: PROCESSO PARA O BIOBRANQUEAMENTO DE POLPA KRAFT USANDO ASSOCIAÇÕES BACTERIANAS

(51) Int.Cl.: D21C9/10; C12N1/20

(30) Prioridade Unionista: 21/03/2003 US 10/393,353

(73) Titular(es): Council Of Scientific And Industrial Research

(72) Inventor(es): Anil Kumar, Rita Kumar

“PROCESSO PARA O BIOBRANQUEAMENTO DE POLPA KRAFT USANDO ASSOCIAÇÕES BACTERIANAS”

Campo da invenção

A presente invenção relaciona-se a um método de
5 quatro etapas bom para o ambiente, seguro e eficiente, de
biobranquear polpa Kraft usando cepas bacterianas de n^{os} de
acesso MTCC 5096, MTCC 5094, MTCC 5095 e MTCC 5098, uma as-
sociação microbiana compreendendo uma mistura sinérgica de
isolados bacterianos ligninolíticos de n^{os} de acesso MTCC
10 5094, MTCC 5095 e MTCC 5098, cepas bacterianas de n^{os} de
acesso MTCC 5096, MTCC 5094, MTCC 5095 e MTCC 5098, e um
processo de preparar um inóculo do isolado bacteriano de n^o
de acesso MTCC 5096, adicionalmente, um processo para a pre-
paração de uma associação compreendendo os isolados bacteri-
15 anos ligninolíticos de n^{os} de acesso MTCC 5094, MTCC 5095 e
MTCC 5098, além disso, um processo para a preparação de sus-
pensão de polpa para o biobranqueamento.

Antecedentes e referências da técnica anterior

O processo de remoção de lignina de polpas quími-
20 cas para produzir polpa acabada brilhante ou completamente
branca é chamado "Branqueamento". Ele é necessário por ra-
zões estéticas e para o aperfeiçoamento das propriedades do
papel, porque a lignina residual excessiva deixada após a
polpação confere ao papel uma cor marrom indesejada. O bran-
25 queamento da polpa Kraft nos dias atuais usa grandes quanti-
dades de substâncias químicas à base de cloro. O uso destas
substâncias químicas gera substâncias orgânicas cloradas, as
quais, sendo altamente tóxicas, causam diversos perigos à

saúde. Assim, um método alternativo e de custo efetivo, i.e., o uso de micróbios e enzimas, têm proporcionado um modo muito simples e econômico de reduzir o uso de cloro e outras substâncias químicas de branqueamento.

5 Visão Detalhada dos Diversos Organismos

Fungos

A lignina é o polímero aromático mais abundante na biosfera. Ela é encontrada na parede celular de todas as plantas vasculares em associação com a celulose e a hemicelulose. Porque as ligações entre unidades na lignina não são hidrolisáveis, a lignina é difícil de degradar química ou biologicamente. A lignina circunda a celulose na parede celular da planta formando uma matriz, a qual é ela própria resistente à degradação. A biodegradação da lignina é responsável por muito da destruição natural da madeira em uso, e ela pode ter uma função importante na patogênese da planta. Por outro lado, as aplicações potenciais utilizando organismos que degradam a lignina e as suas enzimas tornaram-se atrativas, porque elas podem proporcionar tecnologias boas para o ambiente para a indústria de polpa e papel. Até o momento, somente alguns grupos de organismos são capazes de degradar os polímeros complexos de lignina, e eles são melhor exemplificados pelos fungos de decomposição branca. A maior parte da pesquisa em relação à biodegradação da lignina tem sido centrada em alguns fungos somente, tais como *Phanerochaete chrysosporium*, *Streptomyces viridosporus*, *Pleurotus eryngii*, *Trametes trogii*, *Fusarium proliferatum* (Regaldo e col., 1997) etc. (1).

Os fungos basidiomicetos degradadores da madeira, que causam a decomposição branca na madeira, são os degradadores de lignina mais eficientes na natureza (Kirk e Farrell, 1987; Eriksson e col., 1990), e eles são, talvez, os maiores agentes da natureza para reciclar o carbono dos tecidos lignificados. Nenhum outro microorganismo como cultura pura foi descrito por mineralizar os tecidos lignificados tão eficientemente (Kirk e Cullen, 1998). Eles são um grupo de fungos superiores taxonomicamente heterogêneos, caracterizados por sua capacidade única de despolimerizar e mineralizar a lignina usando um grupo de enzimas ligninolíticas extracelulares. A degradação da lignina pelos fungos de decomposição branca tem sido extensivamente estudada durante os últimos trinta anos em relação às aplicações bioquímicas, tais como a biopolpação, o biobranqueamento, o tratamento dos efluentes da moagem da polpa e a biorremediação do solo (Akhtar e col., 1992, 1998; Lamar e col., 1992; Messner e Srebotnik, 1994).

Em 1992, Frederick Archibald (2) demonstrou que o fungo *Trametes versicolor* era capaz de descoloração e deslignificação substanciais de polpas Kraft industriais não branqueadas, durante 2 a 5 dias.

Um ano mais tarde, o mesmo grupo de trabalhadores demonstrou que um sobrenadante de cultura de biobranqueamento continha todos os componentes necessários para o biobranqueamento e a deslignificação da polpa Kraft de madeira-de-lei (HWKP), porém o sobrenadante necessitava de contato frequente com o fungo para manter estas atividades. Assim, me-

tabólitos fúngicos pequenos instáveis podem ser os componentes vitais do sistema de Biobranqueamento renovados ou substituídos pelo fungo. Quase todo o CO₂ produzido pela HWKP contendo culturas origina-se da glicose adicionada, indicando que a HWKP na cultura marcadamente aumentou a produção de diversos metabólitos ácidos da cultura, incluindo o oxalato, o glioxilato e o glicolato.

Os *Aspergilli*, os ascomicetos versáteis, são também verificados por transformar em uma taxa rápida um amplo espectro de compostos aromáticos relacionados à lignina. Eles são mostrados por superproduzir altos níveis de enzimas hemicelulolíticas. (4)

Maria Teresa et al. mostraram que a Cepa BOS55 de *Bjerkandera sp.* é um fungo de decomposição branca que pode branquear a polpa Kraft de eucalipto deslignificada com oxigênio extraída com EDTA (UKP) sem nenhuma exigência por manganês. Além disso, sob condições livres de manganês, a adição de ácidos orgânicos fisiológicos simples (p.ex., Glicolato, glioxilato, oxalato e outros) a 1-5 mM estimulou os ganhos de brilho e a deslignificação da polpa duas a três vezes, em comparação com os resultados que não receberam ácidos. A estimulação foi atribuída à produção aumentada de MnP e LiP, bem como às concentrações fisiológicas aumentadas de álcool veratrílico e oxalato. Estes fatores contribuíram para a produção muito aperfeiçoada de radicais de ânion de superóxido, os quais podem ter sido responsáveis pelo biobranqueamento mais extensivo. (5)

Bactérias

A função das bactérias na biodegradação da lignina ainda é uma questão de conjectura. Alguns trabalhadores têm demonstrado que tanto a cultura mista (Sundman et al., 1968) quanto a cultura pura de bactérias (Sorensen, 1962) pode desenvolver-se sobre a lignina como uma fonte de carbono. A *Pseudomonas spp.* foi reivindicada por Kawakami (1976) e por Odier e Monties (1977) por degradar as ligninas das plantas. Odier e Montis também indicaram diversas outras cepas bacterianas que podem usar, dentro de um tempo de sete dias, mais do que 50% da lignina suprida em um meio mineral contendo glicose.

Diversas *Nocardia* e *Pseudomonas spp.*, bem como algumas bactérias não identificadas, isoladas de água de lago contendo altas cargas de lignina residual, foram testadas quanto a sua capacidade de liberar $^{14}\text{CO}_2$ de deidropolímero (DHP) especificamente marcado com ^{14}C de ligninas de álcool coniferílico ou palha de milho. Entretanto, somente algumas delas puderam liberar quantidades significativas de $^{14}\text{CO}_2$ da lignina marcada. A *Nocardia spp.* testada era mais ativa do que a *Pseudomonas spp.* e as bactérias não identificadas. (6)

Os Actinomicetos são bactérias filamentosas que são encontradas no solo e adubos compostos onde a lignocelulose é decomposta. Diversos relatórios proporcionam evidência que diversas espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* são capazes de degradar a lignina. Os outros Actinomicetos degradadores de lignina incluem *Thermomonospora mesophila*, *Actinomadura*, *Micromonospora* com *Streptomyces* exi-

bindo a maior capacidade de degradação da lignina. Na maioria dos estudos, a enzima degradadora de lignina foi produzida em níveis mais elevados em culturas contendo lignocelulose, o que sugere que um mecanismo de indução estava ativo.

5 Ajit Verma et al. (1994), enquanto trabalhando sobre a relação simbiótica entre as térmitas e os seus micróbios intestinais, concluiu que ambas as bactérias do solo e do intestino das térmitas desempenham uma função importante na despolimerização do polímero. As bactérias do intestino
10 têm a capacidade de degradar materiais celulósicos e hemicelulósicos mais eficientemente. Diversos isolados bacterianos que hidrolisam a celulose e a hemicelulose foram obtidos na cultura pura a partir do intestino da térmita. Alguns destes são *Arthrobacter sp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Serratia marcescens*. Somen-
15 te algumas bactérias de decomposição de xilano foram obtidas a partir do intestino da térmita (*Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*). A questão da degradação da lignina pelas térmitas é intrigante, visto que muito do intestino da
20 térmita é anaeróbico e os mecanismos anaeróbicos naturais da degradação da lignina são desconhecidos. (7)

 Berrocal et al. (1997) mostraram que os filtrados sem células de *Streptomyces sp.* desenvolvidos em fermentação no estado sólido eram capazes de solubilizar até 20% da lignina de [¹⁴C]. A atividade das duas enzimas, peroxidase extracelular e fenol oxidase (lacase), foi verificada por correlacionar-se com as taxas tanto de solubilização quanto de mineralização da lignina. (8)

A presença de bactérias na madeira decomposta frequentemente em associação com os fungos tem sido o assunto de diversos relatórios. Entretanto, a sua função exata na degradação dos componentes da madeira não está ainda clara.

5 Enquanto que a disponibilidade de nitrogênio nutriente reprime o metabolismo da lignina de ^{14}C sintética a CO_2 pelo *Phanerochaete Chrysosporium*, altos níveis de nitrogênio orgânico eram ótimos para a degradação da lignina pela bactéria *Streptomyces badius*. (9)

10 As enzimas são a base catalítica do metabolismo e, como tais, são o foco de pesquisa mundial intensa, não somente na comunidade biológica, como também com projetistas/engenheiros de processo, engenheiros químicos e pesquisadores que trabalham em outros campos científicos. Desde os
15 tempos antigos, as enzimas têm desempenhado uma função central em muitos processos de fabricação, tal como na produção de vinho, queijo, pão, etc. A metade final do século vinte viu uma expansão sem precedente em nosso conhecimento do uso de microorganismos, seus produtos metabólicos, e enzimas em
20 uma área ampla de pesquisa básica e suas aplicações industriais potenciais. Somente nas duas décadas passadas, entretanto, as enzimas microbianas têm sido usadas comercialmente na indústria de Polpa e Papel. (10)

A aplicação mais comum das enzimas na indústria de
25 papel é para aumentar o branqueamento. Pelo menos 15 patentes ou divulgações de patentes tratando dos tratamentos enzimáticos para aumentar o branqueamento de polpas Kraft foram apresentados entre 1988 e 1993.

A polpação Kraft, também conhecida como polpação de sulfato, ou química, utiliza o enxofre para retirar a fibra das árvores. A polpação Kraft usa menos do que 50% da árvore. O restante acaba como lama, que é queimada, espalhada sobre a terra ou misturada com terra. Um prêmio da polpação Kraft é que as substâncias químicas podem ser recicladas e reutilizadas na moagem. Um outro é que a fibra Kraft é excepcionalmente forte ("Kraft" significa "forte" em Alemão). A polpa Kraft é normalmente escura e é frequentemente branqueada com compostos de cloro.

O processo Kraft é responsável por 85% da produção total de polpa nos Estados Unidos, e é o maior componente da manufatura de papel no mundo. A polpação Kraft remove a lignina, dissolve e degrada a hemicelulose sem danificar a celulose. Infelizmente, os produtos da degradação gerados durante a polpação ficam presos na matriz e conferem uma cor marrom à polpa Kraft. O cozimento consome substâncias químicas de polpação, e o xilano residual (juntamente como os produtos da degradação covalentemente ligados) precipita-se sobre as superfícies das fibras celulósicas. Os cromóforos são acreditados serem compostos de lignina residual e produtos da degradação de carboidratos. Eles são difíceis de extrair porque estão covalentemente ligados às porções de carboidrato na matriz da polpa. Os fabricantes usam o cloro elementar (Cl_2) e o dióxido de cloro (ClO_2) para branquear os cromóforos, e então eles extraem a polpa para produzir o papel branco. O custo do Cl_2 é aproximadamente de \$12 a \$15 por tonelada métrica de polpa, porém, porque isto resulta na

produção de compostos aromáticos clorados, são empregados agentes de branqueamento alternativo, tais como O_2 , ClO_2 ou H_2O_2 . Estes podem ser diversas vezes mais caros do que o Cl_2 . O branqueamento aumenta substancialmente o valor do produto, assim a despesa adicional pode ser justificada.

O branqueamento com cloro pode criar problemas ambientais. Os subprodutos da utilização destas substâncias químicas são substâncias orgânicas cloradas, algumas das quais são tóxicas, mutagênicas, persistentes, e bioacumulam-se, e causam diversas desordens nocivas nos sistemas biológicos (Onysko, 1993). As opções disponíveis são a deslignificação com oxigênio, o cozimento prolongado, e a substituição por cloro, peróxido de hidrogênio, e ozônio do dióxido de cloro. Porém, a maioria destes métodos envolve alto investimento de capital para a mudança de processo. Assim, um método alternativo e de custo efetivo, i.e., o uso de enzimas, tem proporcionado um modo muito simples e econômico de reduzir o uso de cloro e de outras substâncias químicas de branqueamento.

Até agora, todos os trabalhos básicos e de pesquisa aplicada têm se concentrado nos fungos somente. No caso do biobranqueamento da polpa bruta, a aplicação de fungos não é viável devido ao seu impedimento estrutural causado pelas hifas fúngicas. O branqueamento da polpa usando enzimas purificadas a partir de fungos não é econômico, visto que as etapas de purificação das enzimas tornam o processo caro e longo. Portanto, existe uma necessidade de se desenvolver um processo economicamente viável e eficaz para o bi-

obranqueamento da polpa.

Objetivos da presente invenção

O objetivo principal da presente invenção é proporcionar um processo para branquear a polpa Kraft de madeira-de-lei usando isolados bacterianos através de um processo de quatro estágios.

Um outro objetivo da invenção é proporcionar uma associação bacteriana definida para o branqueamento da polpa Kraft de madeira-de-lei, que seja segura, econômica, e eficiente.

Um outro objetivo da invenção é proporcionar as cepas bacterianas usadas nesta invenção para o biobranqueamento da polpa Kraft.

Ainda um outro objetivo da presente invenção é desenvolver um método de preparar um inóculo usando as cepas do presente Pedido.

Sumário da presente invenção

A presente invenção relaciona-se a um método de quatro etapas bom para o ambiente, seguro, e eficiente, de biobranquear a polpa Kraft usando cepas bacterianas de n^{os} de acesso MTCC 5096, MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, uma associação microbiana compreendendo uma mistura sinérgica de isolados bacterianos ligninolíticos de n^{os} de acesso MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, cepas bacterianas de N^{os} de acesso MTCC 5096, MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, e um processo de preparar um inóculo do isolado bacteriano de n^o de acesso MTCC 5096, adicionalmente, um processo para a preparação de uma associação compreendendo os isolados bacteri-

anos ligninolíticos de n^{os} de acesso MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, além disso, um processo para a preparação de suspensão de polpa para o biobranqueamento.

Descrição detalhada da presente invenção

5 A presente invenção relaciona-se a um método de quatro etapas, bom para o ambiente, seguro, e eficiente, de biobranquear a polpa Kraft usando cepas bacterianas de n^{os} de acesso MTCC 5096, MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, uma associação microbiana compreendendo uma mistura sinérgica de
10 isolados bacterianos ligninolíticos de n^{os} de acesso MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, cepas bacterianas de N^{os} de acesso MTCC 5096, MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, e um processo de preparar um inóculo do isolado bacteriano de n^o de acesso MTCC 5096, adicionalmente, um processo para a pre-
15 paração de uma associação compreendendo os isolados bacterianos ligninolíticos de n^{os} de acesso MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, além disso, um processo para a preparação de suspensão de polpa para o biobranqueamento.

 Em mais uma outra modalidade da presente invenção,
20 em que um método de quatro etapas, bom para o ambiente, seguro, e eficiente, de biobranquear a polpa Kraft usando cepas bacterianas de n^{os} de acesso MTCC 5096, MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, o dito método compreendendo as etapas de:

- inocular a suspensão de polpa com um inóculo da cepa
25 bacteriana MTCC 5096 tendo atividade de xilanase como o estágio um,
- incubar a polpa inoculada por duração de tempo variando entre cerca de 15-20 horas, em torno de 100-120 rpm, em

aproximadamente 26-32°C,

- adicionar hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio à polpa inoculada da etapa (c) para a extração com álcali como o estágio dois,
- 5 • incubar em torno de 65-70°C por duração de tempo de aproximadamente 1,5 - 2,5 horas,
- filtrar a polpa e lavar com água destilada estéril,
- suspender a polpa lavada em meio de sal mínimo novo,
- inocular a suspensão de polpa com a associação compre-
10 endendo as cepas bacterianas ligninolíticas de n^{os} de acesso MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098 como o estágio três,
- incubar a polpa inoculada da etapa (g) por um período de cerca de 15 - 20 horas, em torno de 100-120 rpm, em
15 aproximadamente 26-32°C, em pH de cerca de 5-9,
- repetir as etapas (b) a (e) com extração por álcali como o estágio 4 para obter a polpa com % de brilho de cerca de 17%.

Em uma outra modalidade da presente invenção, a
20 temperatura durante o 3º estágio do biobranqueamento é aproximadamente 30°C.

Em mais uma outra modalidade da presente invenção, o pH durante o 3º estágio de biobranqueamento é de aproximadamente 8.

25 Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, são adicionados 20-30 mg de hidróxido de sódio e 200-250 ul de peróxido de hidrogênio.

Em ainda uma outra modalidade da presente inven-

ção, o meio de sal mínimo (MSM) tem cerca de 0,1 a 1,0% de glicose.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, as cepas da associação estão na razão de 1:1:1.

5 Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, uma associação microbiana compreende uma mistura sinérgica de isolados bacterianos ligninolíticos de nº de acesso MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098.

10 Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, uma cepa bacteriana de Nº de acesso MTCC 5096 é útil para biobranquear a polpa.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a cepa mostra biobranqueamento de cerca de 8%.

15 Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, uma cepa bacteriana é de Nº de acesso MTCC 5094.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, uma cepa bacteriana é de Nº de acesso MTCC 5095.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, uma cepa bacteriana é de Nº de acesso MTCC 5098.

20 Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, um processo de preparar um inóculo do isolado bacteriano de nº de acesso MTCC 5096 compreende as etapas de:

- isolar a cepa bacteriana,
- cultivar o isolado bacteriano sobre o meio contendo o
- 25 extrato de solo e os meios nutrientes,
- inocular o isolado bacteriano,
- incubar e centrifugar a cultura resultante após atingir a D.O. desejada (1,00-2,00) para obter a pelota,

- suspender a pelota em tampão de fosfato de aproximadamente 0,03-0,05M em torno de pH 6,8, e
- obter o inóculo.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, o isolado é cultivado sobre o meio contendo o extrato de solo e os meios nutrientes em proporções iguais.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, o isolado bacteriano é inoculado em meio de sal mínimo com glicose e a incubação é realizada por agitação a 100-120 rpm e em uma temperatura variando de 28-34°C.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, o crescimento resultante é centrifugado em rpm apropriada, preferivelmente a 8000-12000 rpm, por um período de aproximadamente 20-30 minutos, em uma temperatura de 1-4°C.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a pelota é suspensa em tampão apropriado, tal como o tampão de fosfato ou o tampão de tris.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, um processo para a preparação de uma associação compreendendo os isolados bacterianos ligninolíticos de nos de acesso MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098 compreende as etapas de:

- isolar as cepas bacterianas,
- inocular os isolados bacterianos individualmente, incubar e desenvolver sob condições definidas e misturá-los em proporções aproximadamente iguais na base dos valores de densidade óptica, e
- centrifugar a suspensão resultante para obter a pelota,

- suspender a pelota em tampão de fosfato, e
- obter a associação consistindo em três cepas bacterianas.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a incubação dos isolados bacterianos é realizada por agitação em aproximadamente 100-120 rpm e a 30-35°C, por um período de 16 a 18 horas.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a incubação dos isolados bacterianos é efetuada em uma temperatura variando entre 30°C - 37°C, por um período de 16 - 18 horas.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a associação microbiana resultante é centrifugada em aproximadamente rpm, preferivelmente a 8000 - 12000 rpm, por um período de aproximadamente 20 - 30 minutos de 1-4°C.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a pelota é suspensa em tampão apropriado, tal como o tampão de fosfato ou o tampão de tris.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, um processo para a preparação de suspensão de polpa para o biobranqueamento compreende as etapas de:

- autoclavar a polpa não branqueada úmida em torno de 82,74- 193,05 kPa (12-28 psi) por aproximadamente 15-25 minutos, e
- suspender a polpa autoclavada em um meio compreendendo meio de sais mínimos com 0,2% de glicose, sob condições estéreis.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, em que a polpa não branqueada a 7 - 10% é autoclavada.

A relação entre o nº de depósito local e os nºs de depósitos internacionais é como dada abaixo:

- 5 1. CBTCC/51-03 - MTCC 5096
2. CBTCC/52-03 - MTCC 5094
3. CBTCC/53-03 - MTCC 5095
4. CBTCC/54-03 - MTCC 5098

Características das Bactérias:

10 MTCC 5096

Gram -, bastões

MTCC 5094

Gram -, pequenos bastões

MTCC 5095

15 Gram -, cocos

MTCC 5098

Gram -, bastões longos

Os nºs acima estabelecidos são usados de forma intercambiável, entretanto, as reivindicações estão estritamente restritas aos detalhes do depósito Internacional somente.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a presente invenção fornece um novo processo biológico para branquear a polpa Kraft de madeira-de-lei. Este processo envolve exclusivamente o uso de isolado bacteriano para branquear a polpa. O processo de quatro estágios inclui a inoculação da polpa duas vezes com os isolados bacterianos em estágios diferentes, seguida por lavagem com álcali. Os

isolados bacterianos usados no presente processo foram isolados de um local específico, localizado em Roorkee, Índia.

Os isolados bacterianos relacionados à presente invenção estão depositados no Depósito Internacional, Instituto de Tecnologia Microbiana, Chandigarh, Índia, um depósito reconhecido pela WIPO.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, estes isolados bacterianos estão exibindo uma capacidade notável de branquear a polpa Kraft de madeira-de-lei sob condições definidas.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, os isolados bacterianos na presente invenção foram isolados de uma armazenagem de madeira situada em Roorkee, Índia, onde a serragem acumulava-se continuamente durante o período de 10-12 anos.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, os isolados bacterianos na presente invenção incluem bactérias degradadoras de xilano e as bactérias ligninolíticas, de modo que foi realizado um enriquecimento diferente para ambos os tipos de bactérias, antes do isolamento.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, para aperfeiçoar o rendimento das bactérias degradadoras de xilano, 5 g de solo novo do dito local foram inoculados no frasco autoclavado de 500 mL contendo 100 mL de extrato de solo, 0,2% de xilano e 50 µL de Candid B (antifúngico). O frasco de enriquecimento foi mantido a 120 rpm por 96 horas, a 30°C.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, em um esforço de induzir as bactérias ligninolíticas, 5 g do dito solo novo foram inoculados em frasco de 500 mL contendo 100 mL de caldo nutriente, 100 mL de extrato de solo, 0,3% de lignina, álcool veratrílico a 1 mM, guaicol a 1 mM e 50 μ L de Candid B. O frasco de enriquecimento foi mantido a 30°C/120 rpm por 96 horas.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, para a preparação do extrato de solo, 1 kg de solo foi retirado e seco a 50°C por 2 horas. 400 g de solo seco foram dissolvidos em 960 mL de água destilada simples e autoclavados a 103,42 kPa (15 lbs) por 1 hora. Após autoclavar, a amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (extrato) foi coletado e armazenado em frasco estéril para a preparação do frasco de enriquecimento e uso adicional.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, as amostras de solo enriquecido foram diluídas em série em solução salina a 0,85%. 100 μ L de cada diluição respectiva foram espalhados sobre placas de Petri contendo extrato de solo, 50% de nutriente ágar e 0,2% de xilano para as bactérias degradadoras de xilano ou 0,2% de lignina para o isolamento das bactérias ligninolíticas. As placas assim obtidas foram incubadas a 30 ± 2 °C por 24 - 96 horas na posição invertida.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, na base de morfologia e cor da colônia, 60 isolados totais foram selecionados para checar a sua capacidade para

branquear a polpa de madeira-de-lei. As colônias isoladas individuais foram coletadas e estriadas sobre placas novas contendo o mesmo meio. A etapa acima descrita foi repetida até que fossem obtidas colônias puras.

5 Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a triagem das culturas isoladas para a secreção de xilanas extracelulares foi feita, para a qual diferentes isolados foram cultivados em MSM e 0,7% de xilano a 120 rpm/37°C. O ensaio de xilanase foi feito após cada 24 hs.

10 Para a determinação da atividade da β -xilnanase, 200 μ L de cultura de isolados e 800 μ L de 0,7% (peso/vol) de xilano foram misturados e incubados a 55° C por 10 min. A reação foi interrompida por adição de 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico e a solução foi bem misturada e então

15 aquecida em banho de água fervente por 15 min. Como um controle, 800 μ L de xilano foram incubados e esfriados, e 200 μ L de tampão de fosfato e 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico foram adicionados para corrigir os açúcares redutores na solução de substrato. Os equivalentes de

20 açúcares redutores foram medidos nas soluções tanto original quanto de controle por medição da densidade óptica a 540 nm (Miller et al. 1960) com D-xilose como o padrão. Uma unidade de atividade da β -xilnanase foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, sob

25 as condições dadas.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, para checar a atividade ligninolítica das bactérias isoladas, 10 mL de 0,4% de lignina foram levados para tubos

de teste de 30 mL e o isolado bacteriano individual foi inoculado. Após 3 dias, a descoloração da lignina foi observada.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, o branqueamento da polpa Kraft de madeira-de-lei usando bactérias isoladas foi realizado em quatro estágios. No primeiro estágio, foi usado o isolado bacteriano que secreta xilanase, enquanto o segundo estágio envolveu a lavagem com álcali. O terceiro estágio incluiu o uso de bactérias ligninolíticas, seguido por extração com álcali no quarto estágio.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção, a polpa Kraft de madeira-de-lei não branqueada foi retirada do Century Paper Mill, Índia. 7 g de polpa autoclavada úmida foram dissolvidos em 100 mL de meio de sal mínimo (MSM) autoclavado com 0,3% de glicose em frasco esterilizado de 250 mL. O isolado bacteriano positivo de xilanase tendo D.O. de 1,00 foi inoculado em razão de 1:5. O frasco de branqueamento acima mencionado foi mantido a 28°C/120 rpm por 20 horas. Após 20 horas de incubação, 30 mg de hidróxido de sódio (NaOH) e 250 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram adicionados e o frasco foi mantido a 70°C por 2 horas. A polpa foi filtrada usando papel Whatman simples e novamente suspensa em 100 mL de MSM novo com 0,3% de glicose em condições estéreis. A associação compreendendo três bactérias ligninolíticas foi adicionada em razão de 1:5 e o frasco foi mantido a 30°C/120 rpm por 20 h. Novamente foi feita a extração com álcali por adição de 30 mg de NaOH e 250 µL

de H₂O₂, seguida por 2 horas de incubação a 70°C. A polpa foi filtrada e suspensa em 100 mL de água tri-destilada fresca. A mesma experiência foi feita para o frasco de controle não tendo nenhuma bactéria.

5 A invenção adicionalmente fornece um processo de quatro estágios para branquear a polpa Kraft de madeira-de-lei usando as bactérias isoladas de local específico, o qual compreende:

- 10 a) cultivar as ditas bactérias isoladas de local específico, sob condições definidas, tais como meios, temperatura, pH, fonte de carbono, etc.;
- 15 b) manter a densidade da cultura bacteriana para os diferentes estágios do processo de branqueamento. O MSM tendo 1,0% de glicose foi usado para desenvolver a cultura em frasco de 250 mL tendo 100 mL de cultura. O frasco de cultura foi incubado a 30°C/120 rpm por 16-18 horas, a fim de obter a D.O. igual a 1,00;
- 20 c) centrifugar a cultura resultante após obter a D.O. desejada (1,00), para obter a pelota;
- d) dissolver a pelota acima mencionada em 20 mL de tampão de PO₄⁻³, 0,05 M, pH 6,8;
- 25 e) preparar a polpa em MSM tendo 0,3% de glicose. 7 g da polpa não branqueada nova são dissolvidos em frasco de 250 mL tendo 100 mL de meio de sais mínimos;
- f) inocular a polpa com a pelota bacteriana específica para xilanase como formada em (d) e incubar o frasco a 28°C/120 rpm por 20 horas;

- g) adicionar 30 mg de hidróxido de sódio e 250 µL de peróxido de hidrogênio no frasco mencionado em (f) e incubar de 2 horas a 70°C;
- h) lavar e filtrar a polpa usando papel Whatman simples;
5
- i) suspender a polpa lavada em 100 mL de MSM novo com 0,3% de glicose e álcool veratrílico a 1 mM;
- j) inocular a associação compreendendo três bactérias ligninolíticas como preparadas em (b), (c) e (d) e
10 incubar por 20 horas a 30°C/120 rpm;
- k) adicionar 30 mg de hidróxido de sódio e 250 µL de peróxido de hidrogênio no frasco mencionado em (f) e incubar de 2 horas a 70°C como em (g);
- l) lavar e filtrar a polpa usando papel Whatman simples;
15
- m) secar a polpa a 50°C por 5 horas e medir o brilho.

Em uma modalidade da presente invenção, as bactérias são isoladas de local específico com serragem, localizado em Roorkee, Índia. O isolamento envolve enriquecimento
20 definido e meios diferentes para as bactérias que secretam xilanase e as bactérias ligninolíticas.

Em uma outra modalidade da presente invenção, os isolados bacterianos acima mencionados são cultivados em meio de sal mínimo tendo 1% de glicose e o crescimento é mo-
25 nitorado para obter a D.O. desejada a 30°C/120 rpm/16-18 h.

Em uma outra modalidade da presente invenção, a cultura bacteriana é centrifugada e suspensa em 20 mL de tampão de PO_4^{-3} , 0,05 M, pH 6,8, para preparar o inóculo para

o estudo de branqueamento.

Na modalidade adicional da presente invenção, a xilanase é testada por um método conhecido (Miller et al. 1960).

5 Em uma outra modalidade da presente invenção, a polpa é preparada em MSM tendo 0,3% de glicose, 7-10 gramas de polpa não branqueada nova são dissolvidos em frasco de 250 mL tendo 100 mL de MSM.

10 Em uma outra modalidade da presente invenção, a polpa é inoculada com pelota bacteriana específica para xilanase e o frasco é mantido a 28°C/120 rpm por 20 horas.

Na modalidade da presente invenção, 20-30 mg de hidróxido de sódio e 200-250 µL de peróxido de hidrogênio são adicionados no frasco e incubados a 70°C/2 horas.

15 Em uma outra modalidade da presente invenção, a lavagem e a filtração da polpa são realizadas usando papel Whatman simples e a polpa é transferida para 100 mL de MSM novo com 0,3% de glicose e álcool veratrílico a 1 mM.

20 Na modalidade adicional da presente invenção, a associação ligninolítica compreendendo três isolados bacterianos é adicionada e o frasco é mantido a 30°C/100-120 rpm por duas horas.

25 Em uma outra modalidade da presente invenção, 20-30 mg de hidróxido de sódio e 200-250 µL de peróxido de hidrogênio são adicionados no frasco e incubados a 70°C/2 horas.

Na modalidade adicional da presente invenção, a lavagem e a filtração da polpa são realizadas usando papel Whatman simples e a polpa é seca a 50°C por 5 horas.

Exemplo 1

5 Uma alça da placa de ágar de isolado bacteriano designado como CBTCC/51-03 foi inoculada em 100 mL de MSM com 1% de glicose. A cultura foi incubada a 30°C por 16-24 horas em um agitador incubador a 100-120 rpm. Após incubação, a densidade óptica foi medida a 650 nm. A densidade óptica da cultura foi mantida em 1,00 por diluição ou concentração da suspensão bacteriana. A cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. A pelota foi dissolvida em 20 mL de tampão de fosfato, 0,05 M, pH 6,8.

A suspensão de polpa da madeira-de-lei é preparada dissolvendo 10 g de polpa úmida autoclavada em 100 mL de MSM tendo 0,2% de glicose. 1 mL de pelota bacteriana como preparada acima foi inoculado na polpa e o frasco foi incubado a 35°C, a 100 rpm, por 15 h. Não foi observada nenhuma brancura significativa na polpa por causa da temperatura inadequada e menos inóculo bacteriano.

Exemplo 2

Uma alça da placa de ágar do isolado bacteriano designado como CBTCC/51-03 foi inoculada em 100 mL de MSM com 1% de glicose. A cultura foi incubada a 30°C por 16-24 horas em um agitador incubador a 100-120 rpm. Após incubação, a densidade óptica foi medida a 650 nm. A densidade óptica da cultura foi mantida em 1,00 por diluição ou concentração da suspensão bacteriana. A cultura foi centrifugada a

10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. A pelota foi dissolvida em 20 mL de tampão de fosfato, 0,05 M, pH 6,8.

A suspensão de polpa da madeira-de-lei é preparada dissolvendo 7 g de polpa úmida autoclavada em 100 mL de MSM
5 contendo 0,2% de glicose. 10 mL de pelota bacteriana como preparada acima foram inoculados na polpa e o frasco foi incubado a 35°C, a 100 rpm, por 15 h. Não foi observada nenhuma brancura significativa na polpa por causa da temperatura inadequada e menos inóculo bacteriano.

10 Exemplo 3

400 mL de MSM foram inoculados com uma cultura com alças cheias a partir de placa de ágar do isolado bacteriano designado como CBTCC/51-03. A cultura foi incubada a 30°C por 16-24 horas em um agitador incubador a 100-120 rpm. Após
15 incubação, a densidade óptica foi medida a 650 nm. A densidade óptica da cultura foi mantida em 1,00 por diluição ou concentração da suspensão bacteriana. A cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. A pelota foi dissolvida em 80 mL de tampão de fosfato, 0,05 M, pH 6,8.

20 Quatro frascos de suspensão de polpa foram preparados individualmente por dissolução de 7 g de polpa úmida autoclavada em 100 mL de MSM tendo 0,2% de glicose. 20 mL de inóculo bacteriano como preparado acima foram inoculados em cada frasco. O primeiro frasco foi mantido a 22°C, enquanto
25 que o segundo frasco a 28°C, o terceiro a 34°C e o quarto a 40°C. A extração com álcali foi feita para todos os frascos por incubação da polpa a 70°C por duas horas na presença de NaOH e H₂O₂. O frasco mantido a 28°C era mais brilhante (8%)

em comparação com os outros frascos (Tabela 1).

Tabela 1: Otimização da temperatura do processo de biobranqueamento usando CBTCC/51-03

Nº da S.	Inóculo	Temperatura	Brilho
1º Frasco	20 mL	22 °C	2%
2º Frasco	20 mL	28 °C	8%
3º Frasco	20 mL	34 °C	5%
4º Frasco	20 mL	40 °C	3%

Exemplo 4

5 O experimento de biobranqueamento foi realizado em quatro etapas. O primeiro inóculo foi preparado por inoculação de 400 mL de MSM com um crescimento de alças cheias a partir da placa de ágar do isolado bacteriano designado como CBTCC/51-03. O segundo inóculo foi preparado por inoculação

10 de três frascos individualmente tendo 150 mL de MSM com um crescimento de alças cheias de CBTCC/52-03, CBTCC/53-03 e CBTCC/54-03. Todos os frascos foram incubados a 30°C por 16-24 horas em um agitador incubador a 100-120 rpm. Após incubação, a densidade óptica foi medida a 650 nm. A densidade

15 óptica da cultura foi mantida em 1,00 por diluição ou concentração da suspensão bacteriana. A primeira cultura foi centrifugada separadamente, enquanto as três culturas para preparar o segundo inóculo foram misturadas igualmente e centrifugadas juntas. A pelota da primeira cultura foi dis-

20 solvida em 80 mL de tampão de fosfato, 0,05 M, pH 6,8, enquanto a pelota das três culturas reunidas foi dissolvida em 90 mL de tampão de fosfato, 0,05 M, pH 6,8.

Oito frascos de polpa foram preparados por disso-

lução de 7 g de polpa úmida em cada 100 mL de MSM tendo 0,2%. Os primeiros quatro frascos foram inoculados com 20 mL do primeiro inóculo de CBTCC/51-03. Todos os frascos foram incubados a 28°C/120 rpm por 20 horas. Após 20 horas de incubação, 30 mg de NaOH e 250 µL de H₂O₂ foram adicionados em cada frasco e incubados a 70°C por 2 horas. A polpa foi filtrada usando papel Whatman simples e novamente suspensa nos quatro frascos tendo 100 mL de MSM novo com 0,2% de glicose, em condições estéreis. 20 mL do segundo inóculo (associação) compreendendo três bactérias ligninolíticas foram adicionados a cada frasco. Todos os frascos foram mantidos a 35°C/120 rpm por 20 h. Novamente foi feita a extração com álcali por adição de 30 mg de NaOH e 250 µL de H₂O₂, seguida por incubação de 2 horas a 70°C. A polpa foi filtrada e suspensa em 100 mL de água tri-destilada fresca. A mesma experiência foi realizada para o frasco de controle não tendo nenhuma bactéria. Finalmente, 10-11% de brilho foi observado nos frascos de polpa de teste (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito combinado de uma única bactéria e uma associação de três bactérias na experiência de branqueamento.

Nº da S.	1º Estágio (Única bactéria)	2º Estágio	% de Brilho	3º Estágio (Associação de três bactérias)	4º Estágio	% de Brilho
1.	20 mL de inóculo		8	20 mL de inóculo		10
2.	20 mL de inóculo	Extração	7	20 mL de inóculo	Extração	11

3.	20 mL de inóculo	com	9	20 mL de inóculo	Com	11
4.	20 mL de inóculo	álcali	8	20 mL de inóculo	Álcali	10

Exemplo 5

A fim de ver o efeito do pH e da temperatura sobre o estudo de biobranqueamento, o primeiro inóculo foi preparado para dezesseis frascos de polpa de 100 mL. Para o segundo inóculo, uma associação de três bactérias foi também preparada para dezesseis frascos. O inóculo foi preparado conforme mencionado nos exemplos anteriores.

Os dezesseis frascos de polpa totais foram preparados por dissolução dos 7 g de polpa úmida em cada 100 mL de MSM tendo 0,2%. Os primeiros quatro frascos foram inoculados com 20 mL do primeiro inóculo do isolado bacteriano designado como CBTCC/51-03. O frasco foi incubado a 28°C/120 rpm por 20 horas. Após 20 horas de incubação, 30 mg de NaOH e 250 µL de H₂O₂ foram adicionados e o frasco foi mantido a 70°C por 2 horas. A polpa foi filtrada usando papel Whatman simples e novamente suspensa em quatro 100 mL de MSM novo com 0,2% de glicose, em condições estéreis. 20 mL do segundo inóculo (associação) compreendendo três bactérias ligninolíticas foram adicionados ao frasco. Para ver o efeito da temperatura, os frascos de polpa foram mantidos a 27°C, 30°C, 33°C e 37°C por 20 horas, sob condição de agitação (120 rpm). Novamente foi feita a extração com álcali por adição de 30 mg de NaOH e 250 µL de H₂O₂, seguida por incubação de 2 horas a 70°C. A polpa foi filtrada e suspensa em 100 mL de

água tri-destilada fresca. A mesma experiência foi realizada para o frasco de controle não tendo nenhuma bactéria. Mais brilho foi observado a 30°C (Tabela 3).

Para ver o efeito do pH sobre o estudo de biobranqueamento, os frascos de polpa foram ajustados para pH 5, pH 7, pH 8 e pH 9 usando diferentes tampões. Após o ajuste do pH, estes frascos foram inoculados com 20 mL do primeiro inóculo de isolado bacteriano designado como CBTCC/51-03. O frasco foi incubado a 28°C/120 rpm por 20 horas. Após 20 horas de incubação, 30 mg de NaOH e 250 µL foram adicionados e o frasco foi mantido a 70°C por 2 horas. A polpa foi filtrada usando papel Whatman simples e novamente suspensa em quatro 100 mL de MSM novo tendo pH's 5, 7, 8 e 9 diferentes. 20 mL do segundo inóculo (associação) compreendendo três bactérias ligninolíticas foram adicionados aos frascos. Todos os frascos foram mantidos a 30°C/120 rpm por 20 h. Novamente foi feita a extração com álcali por adição de 30 mg de NaOH e 250 µL de H₂O₂, seguida por incubação de 2 horas a 70°C. A polpa foi filtrada e suspensa em 100 mL de água tri-destilada fresca. A mesma experiência foi realizada para o frasco de controle não tendo nenhuma bactéria. 15% de brilho da polpa foi observado em pH 8 (tabela 4).

Tabela 3: Otimização da temperatura durante o terceiro estágio de experiência de biobranqueamento

Nº da S.	1º Estágio (Única bacté-	Temperatura	2º Estágio	% de Brilho	3º Estágio (Associação de três bac-	Temperatura	4º Estágio	% de Brilho
----------	--------------------------	-------------	------------	-------------	-------------------------------------	-------------	------------	-------------

	ria)				térias)			
1.	20 mL de inóculo	28°C		7	20 mL de inóculo	27°C		10
2.	20 mL de inóculo	28°C	Extra tração	7	20 mL de inóculo	30°C	Extra tração	13
3.	20 mL de inóculo	28°C	com	8	20 mL de inóculo	33°C	com	11
4.	20 mL de inóculo	28°C	álcali	7	20 mL de inóculo	37°C	álcali	11

Tabela 4: Otimização do pH na experiência de biobranqueamento

Nº da S.	1º Estágio (Única bactéria)	pH	2º Estágio	% de Brilho	3º Estágio (Associação de três bactérias)	pH	4º Estágio	% de Brilho
1.	20 mL de inóculo	5		5	20 mL de inóculo	5		11
2.	20 mL de inóculo	7	Extra tração	7	20 mL de inóculo	7	Extra tração	13
3.	20 mL de inóculo	8	com	10	20 mL de inóculo	8	com	15
4.	20 mL de	9	álcali	6	20 mL de	9	álcali	10

	inóculo		li		inóculo			
--	---------	--	----	--	---------	--	--	--

As vantagens principais da invenção

1. O processo de biobranqueamento de quatro estágios desenvolvido substitui o uso de cloro e dióxido de cloro na moagem da polpa e do papel. Assim, não há nenhuma
5 geração de substâncias orgânicas cloradas tóxicas, tais como a dioxina, a bifenila etc.
2. A suspensão bacteriana preparada e a associação cortam o estágio CD de branqueamento químico na moagem da polpa, quando elas atuam de modo sinérgico.
- 10 3. Em comparação com o branqueamento químico, o processo desenvolvido é altamente econômico.
4. O processo de biobranqueamento desenvolvido é ambientalmente seguro porque não há nenhuma geração de poluentes clorados.
- 15 5. O processo desenvolvido é altamente competitivo em termos de tecnologia, viabilidade e aplicabilidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de quatro etapas, bom para o ambiente, seguro e eficiente, de biobranquear a polpa Kraft de madeira-de-lei usando uma cepa bacteriana xilanolítica, *Providencia rettgeri*, de nº de acesso MTCC 5096, e uma associação bacteriana de três bactérias ligninolíticas consistindo em *Serratia marcescens*, de nº de acesso MTCC 5094, *Pseudomonas aeruginosa*, de nº de acesso MTCC 5095, e *Pseudomonas aeruginosa*, de nº de acesso MTCC 5098, o dito método sendo
- 10 **CARACTERIZADO** por compreender as etapas de:
- a. autoclavar a polpa não branqueada úmida a 82,74-193,05 kPa (12-28 psi) por 15-25 minutos,
 - b. suspender a polpa autoclavada em um meio compreendendo meio de saís mínimos com 0,2% de glicose, sob
 - 15 condições estéreis,
 - c. inocular a suspensão de polpa com um inóculo da cepa bacteriana MTCC 5096 tendo atividade de xilanase como o estágio um,
 - d. incubar a polpa inoculada por duração de tempo variando entre 15-20 horas, com uma rotação de 100-120
 - 20 rpm a 26-32°C,
 - e. adicionar hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio à polpa inoculada da etapa (c) para a extração com álcali como o estágio dois,
 - 25 f. incubar a polpa a 65-70°C por duração de tempo de 1,5-2,5 horas,
 - g. filtrar a polpa e lavar com água destilada estéril,
 - h. suspender a polpa lavada em meio de sal mínimo novo,

- i. inocular a suspensão de polpa com a associação compreendendo as cepas bacterianas ligninolíticas de n^{os} de acesso MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098 em proporções iguais, como o estágio três,
- 5 j. incubar a polpa inoculada da etapa (g) por um período de 15-20 horas, com uma rotação de 100-120 rpm a 26-32°C em pH de 5-9, e
- k. repetir as etapas (b) a (e) com extração por álcali como o estágio quatro para obter a polpa com % de
10 brilho de 15%.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a temperatura durante o 3º estágio do biobranqueamento é de 30°C.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pH durante o 3º estágio de
15 biobranqueamento é de 8.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que são adicionados 20-30 mg de hidróxido de sódio e 200-250 µL de peróxido de hidrogênio.

20 5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o meio de sal mínimo (MSM) possui 0,2% de glicose.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as cepas da associação estão
25 na razão de 1:1:1.

RESUMO

“PROCESSO PARA O BIOBRANQUEAMENTO DE POLPA KRAFT USANDO ASSOCIAÇÕES BACTERIANAS”

A presente invenção relaciona-se a um método de
5 quatro etapas, bom para o ambiente, seguro e eficiente, de
biobranquear a polpa Kraft usando cepas bacterianas de n^{os}
de acesso MTCC 5096, MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, a
uma associação microbiana compreendendo uma mistura sinérgi-
ca de isolados bacterianos ligninolíticos de n^{os} de acesso
10 MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098, às cepas bacterianas de
N^{os} de acesso MTCC 5096, MTCC 5094, MTCC 5095, e MTCC 5098,
e a um processo de preparar um inóculo do isolado bacteriano
de n^o de acesso MTCC 5096, adicionalmente, a um processo pa-
ra a preparação de uma associação compreendendo os isolados
15 bacterianos ligninolíticos de n^{os} de acesso MTCC 5094, MTCC
5095, e MTCC 5098, além disso, a um processo para a prepara-
ção de suspensão de polpa para o biobranqueamento.