



## PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção trata de um processo para a produção de lipídios, óleos, biodiesel e/ou óleo combustível a partir de biomassa microbiana e algal oleaginosa utilizando como substrato material amiláceo de batata-doce e/ou mandioca, bem como os resíduos associados aos seus processamentos. Os produtos obtidos da presente invenção são adequados para utilização direta em motores e na geração de energia, ou vapor e na alimentação humana, animal, produção de cosméticos, entre outros.

### HISTÓRICO DA INVENÇÃO

A temática dos biocombustíveis está em pauta a nível mundial. Cada vez mais o preço da gasolina, diesel e derivados de petróleo tende a subir no mercado interno externo. A cada ano o consumo aumenta e as reservas diminuem. Além do problema físico, há o problema político: a cada ameaça de guerra ou crise internacional, o preço do barril de petróleo dispara.

Dentro de uma projeção, a demanda pelo uso do petróleo como matéria-prima para combustíveis se tornará impraticável e o seu declínio deverá acontecer em breve nas próximas décadas. Assim, a pesquisa e o incentivo as fontes alternativas e renováveis se faz presente. Diante disso, é fato que a obtenção de biomassas microbianas e/ou algal oleaginosas como fontes para produção de biocombustíveis, como o biodiesel exercem um importante papel na estratégia energética para um desenvolvimento sustentado.

O biodiesel é um composto de mono-alkilésteres obtidos de ácidos graxos de cadeia longa através da reação de transesterificação de triglicerídeos de lipídios com metanol ou etanol. Entre as muitas vantagens do biodiesel são notáveis: segurança para uso em todos os motores diesel convencionais, pois oferece o mesmo desempenho e durabilidade do motor a diesel de petróleo, é inflamável, reduz as emissões de gases de escape, a fumaça visível, e gases nocivos e odores. É melhor do que o combustível diesel mineral, em termos do teor de enxofre, ponto de fulgor, teor de hidrocarbonetos aromáticos e biodegradabilidade.

Para a utilização do biodiesel no lugar do diesel mineral, não é necessária nenhuma adaptação em caminhões, tratores ou máquinas.

Microorganismos que acumulam grandes quantidades de lipídios são também conhecidos como microorganismos oleaginosos. Sua fisiologia tem sido investigada e suas potenciais aplicações industriais têm sido descritas em diversos trabalhos de cunho científico. A maior parte do óleo natural feita por oleaginosas está na forma de triacilgliceróis (TAG's).

Triacilglicerol é composto por três longas cadeias de ácidos graxos ligados a uma de glicerol. Algumas espécies de microrganismos, por exemplo, chegam a acumular mais de 50% do seu peso corporal na forma de triacilgliceróis. Algumas cepas de leveduras, como *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Lipomyces* sp., entre outras podem acumular lipídios intracelulares em até 5 70% do seu peso seco da biomassa. A maioria dos lipídios são triacilgliceróis (TAG's) contidos nos ácidos graxos de cadeia longa comparáveis aos óleos vegetais convencionais. Assim, microrganismos representam uma fonte alternativa de biodiesel, que não concorre com o mercado existente de oleaginosas.

O biodiesel a partir de biomassa microbiana oleaginosa pode ser obtido em algumas 10 horas em um processo tecnológico integrado, controlado e previsível. Por outro lado, o diesel do petróleo é um combustível não-renovável, uma vez que o petróleo leva milhões de anos para se formar. Apesar da produção mais rápida e independente de safra, os custos dos óleos microbianos são ligeiramente mais elevados que os dos óleos vegetais. Entretanto, existem métodos que permitem melhorar drasticamente os aspectos técnicos e econômicos desses 15 processos. Em particular, a exploração do uso de resíduos agroindustriais como matéria-prima.

Como matérias-primas para obtenção de biomassa oleaginosa microbiana, destacam-se entre diversas fontes de carbono simples e complexas. A glicose pode ser obtida a partir da hidrólise de polímeros naturais como o amido e/ou celulose. Em especial, podem ser potenciais fontes de matérias primas, a mandioca e a batata-doce.

Um dos aspectos positivos do uso destas culturas na produção de biodiesel microbiano 20 seria a possibilidade do cultivo consorciado de mandioca e batata-doce sem prejuízos na produção de ambas as culturas, fato que poderia incrementar a produtividade de amido por hectare.

Em concorrência com esta fonte de açúcares para processos de aplicação 25 biotecnológica figura a cana-de-açúcar e seus derivados caracterizando uma monocultura. Este regime cultivar traz desvantagens ambientais porque exaure o solo com o tempo e reduz a biodiversidade. As desvantagens sociais ocorrem porque reduz o uso da mão-de-obra no campo e as populações rurais. Ainda, no tocante à monocultura da cana de açúcar há desvantagens econômicas, pois apresenta enormes riscos, já que uma única doença ou praga ou a queda do 30 preço do produto no mercado podem por a perder toda a cadeia produtiva regional.

A recuperação de ecossistemas degradados vem recebendo importância crescente diante do quadro cada vez mais drástico de crise ambiental e diminuição da qualidade de vida das populações humanas e naturais. O cultivo sustentável de mandioca e batata-doce constitui

potencial aplicação de resultados positivos em áreas degradadas. Pelo fato de um tubérculo se adaptar muito bem a áreas empobrecidas, a utilização destas variedades para recompor áreas degradadas deve ser considerada.

5 A mandioca é uma raiz originária do Brasil cultivada principalmente nos países em desenvolvimento, onde, dependendo da região na qual é cultivada, serve para diferentes fins.

Na África é uma cultura de subsistência, econômica na Ásia e cultural no Brasil. A mandioca apresenta em sua composição teor médio de amido em comparação com outras tuberosas amiláceas, mas por seus baixos teores de matérias-graxas, proteínas e pectinas, é ideal para extração do amido. A mandioca *in natura* contém entre 25 e 35% de amido em sua  
10 constituição. Este cultivar apresenta uma série de vantagens em relação a outros cultivos, como: fácil propagação, elevada tolerância a longas estiagens, baixo investimento em maquinário para plantio e fácil adaptação a climas tropicais.

A cadeia produtiva da mandioca pode gerar melhores condições de socioeconômicas para pequenos produtores, através da melhoria de emprego e renda em países como o Brasil  
15 (onde existem mais de 80 unidades produtivas industriais), assim como em demais países da América Latina, África e Ásia. Durante a extração do amido da mandioca, volumes expressivos de resíduos sólidos e líquidos são gerados. Para cada tonelada de amido extraída, aproximadamente 928 kg de bagaço de mandioca são produzidos. Tecnologias têm sido desenvolvidas visando reduzir impacto ambiental causado por esses resíduos. O bagaço de  
20 mandioca pode ser considerado como a fração restante do processamento da mandioca que apresenta em sua composição alto teor de amido. O bagaço de mandioca é constituído, em média, por 75% de amido, em base seca.

A manipueira é a água de constituição da raiz ou suco celular, misturada às águas de lavagem das raízes, que é gerada no momento da prensagem da massa ralada para a  
25 fabricação da farinha de mesa ou extração da fécula. Em média, um terço de toda a produção de raízes de mandioca, quando processada, converte-se em manipueira, que comumente é despejada no meio ambiente, nos arredores das fecularias. Os problemas ambientais, causados pela disposição inadequada deste resíduo, decorrem basicamente do alto valor de sua DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (demanda química de oxigênio) associado ao grande  
30 volume produzido.

A batata-doce é uma planta de elevado valor econômico e alimentício, sendo uma das fontes de segurança alimentar para inúmeras populações, principalmente daquelas situadas em regiões pobres. Trata-se de uma cultura rústica e adaptada às condições tropicais e subtropicais

e com grande potencial para o desenvolvimento tecnológico, sendo originária das regiões tropicais da América Central e do Sul. Em sua composição apresenta um teor de amido de aproximadamente 20%. Ainda naturalmente possui aproximadamente 3% de açúcares fermentescíveis, sendo potencial fonte de carbono para a produção de biomassa microbiana oleaginosa.

A presente invenção gera possibilidades no incentivo de recursos para que as organizações de agricultores familiares organizados em cooperativas, associações, agroindústrias, condomínios e consórcios, caracterizados como familiares sejam beneficiadas com o cultivo de mandioca e batata-doce.

A partir destes conhecimentos, a produção de biomassa microbiana rica em lipídios surge como uma alternativa tecnológica inovadora frente às fontes de origem vegetal e/ou animal. Os ácidos graxos produzidos a partir desse processo tecnológico podem ser utilizados na produção de energia e outros fins.

#### DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

O objetivo da presente invenção é propor um processo integrado que utiliza matérias-primas ricas em material amiláceo, preferencialmente a mandioca e batata-doce, e os resíduos associados ao seu processamento, para a produção de óleo microbiano e algal utilizado, por exemplo, como matéria prima para a produção de biodiesel e/ou óleo combustível.

Os produtos biológicos objetos da presente patente de invenção e lipídios de biomassa microbiana e algal não são agentes poluidores e são obtidos de fontes renováveis, compreendendo resíduos do processamento completo de mandioca, batata-doce, outros tubérculos ricos em material amiláceo, efluentes da produção de amido e farinha (manipueira e/ou água de prensagem), efluentes residuais de produção de biomassa microbiana, bem como glicerol produzido a partir da transesterificação dos óleos obtidos.

As figuras, em anexo, apresentam características funcionais desse processo integrado de produção de biodiesel e/ou óleo combustível microbiano e algal de acordo com a presente invenção. As figuras descritas a seguir ilustram:

Figura 1: fluxograma global do processo integrado segundo presente invenção;

Figura 2: fluxograma de pré-tratamento e hidrólise do material amiláceo e celulósico (bagaço de mandioca e/ou batata doce);

Figura 3: fluxograma da etapa de produção de biomassa microbiana oleaginosa;

Figura 4: fluxograma da unidade de produção de biomassa algal oleaginosa.

Figura 5: perfil da cinética de parâmetros de obtenção de biomassa microbiana oleaginosa;

Figura 6: perfil da evolução da produção de biomassa oleaginosa algal e lipídios utilizando caldo centrifugado proveniente da produção de biomassa microbiana oleaginosa.

5 Figura 7: processo de *dowstreaming* ou recuperação de lipídios acumulados nas biomassas microbiana e algal;

Figura 8: fluxograma do processo de transesterificação de lipídios microbiano e algal.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção o processo integrado para produção de biodiesel e/ou óleo combustível a partir de biomassa microbiana oleaginosa oriunda de matérias-primas amiláceas preconiza etapas de obtenção de açúcares fermentescíveis, produção de biomassa rica em lipídios, recuperação da parcela lipídica e transesterificação desta fração para a obtenção de biodiesel e/ou óleo combustível.

15 O processo de acordo com a presente invenção é descrito a seguir por meio da seqüência operacional de processamento das matérias primas amiláceas para a produção de óleo combustível e/ou biodiesel. As etapas do processo de invenção compreendem:

##### Primeira etapa - Etapa de preparo e hidrólise do material amiláceo e fibroso

A presente invenção contempla o uso de fontes renováveis de matéria-prima amilácea, como tubérculos de mandioca e/ou batata-doce além da farinha, bagaço de mandioca, cascas e/ou raspas de mandioca e/ou batata doce, assim como outros resíduos líquidos e/ou sólidos ricos em fibras e amido, obtidos durante processamento dessas matérias primas em fecularias.

Este amido, por ser um polímero, não é disponível aos microrganismos (em particular leveduras) diretamente e necessita de uma transformação a mono e dissacarídeos fermentescíveis, que podem ser realizados utilizando ácidos inorgânicos e/ou enzimas (hidrolases) como catalisadores no processo de hidrólise. Esta etapa, ilustrada nas figuras 1 e 2 é imprescindível para disponibilizar os açúcares redutores requeridos ao crescimento microbiano.

A glicose obtida por meio de hidrólise da fração amilácea dos materiais será fonte de carbono para produção de biomassa e acúmulo de lipídios. A matéria-prima, desta forma, necessita ser processada basicamente por um preparo que constitui a lavagem, descascamento, moagem ou trituração física dos tubérculos para ser convertida por via química e/ou enzimática a açúcares redutores simples.

P	0,019%
Ca	0,013%
Mg	0,033%
DBO	-
DQO	74750 mg L-1
Sólidos totais	56900 mg L-1
Sólidos sedimentáveis	150 mg L-1
pH	4,14

Fonte: Pinho (2007)

O processo integrado previsto pela presente patente preconiza a utilização deste possível resíduo líquido como componente na diluição do material amiláceo na etapa de hidrólise e/ou como meio de cultivo total ou parcial de microrganismos e microalgas oleaginosas.

5

#### Hidrólise do material amiláceo

A presente invenção contempla a hidrólise dos biopolímeros constituinte dos grânulos de amido, quebra das ligações glicosídicas progressivamente, gerando cadeias mais curtas de dextrina, maltose e glicose.

No processo de hidrólise, além de água, há necessidade de catalisadores químicos ou enzimáticos capazes de quebrar ligações glicosídicas, além da temperatura. Para a hidrólise/sacarificação do material amiláceo podem ser utilizados três processos: somente ácido, ácido-enzimático e somente enzimático.

A hidrólise química pode ser realizada através do uso de ácido, diluído ou concentrado, tais como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico e/ou outros ácidos, com concentrações variando de 2 – 20%, temperaturas variando entre 25 – 150 °C, durante um período de reação variando de alguns minutos a diversas horas, com ou sem sistemas de recuperação ou neutralização de ácidos.

A hidrólise enzimática consiste em uma reação biológica mediada por enzimas, em meio aquoso, para a quebra das moléculas de amido em frações menores de glicose. No caso do amido a hidrólise enzimática é empregada para produção de xarope de glicose, maltose e outros açúcares de pesos moleculares variados. O processo de clivagem do amido em unidades menores e fermentescíveis prevê a utilização de dois processos em seqüência para que duas enzimas distintas atuem como catalisadores. Em um primeiro momento, é utilizada enzima alfa-amilase responsável pela liquefação do amido de mandioca e/ou batata. Para esta liquefação inicial, pode ser realizada utilizado, por exemplo, a enzima Liquozyme Supra da Empresa Novozymes e/ou outra com propriedades semelhantes. Essa enzima é uma alfa-amilase termoestável (EC 3.2.1.1) produzida a partir do *Bacillus licheniformis* com atividade aproximada

de 90 KNU/g. 1 KNU é definida como a concentração de enzima que pode hidrolisar 5,26 g de amido solúvel por hora em pH 5,6 a 37 °C. Esta alfa-amilase classificada como uma endoenzima por catalisar especificamente e ao acaso a ruptura das ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,4) do amido, no entanto, sem apresentar ação sobre ligações  $\alpha$  (1,6). A ação desta enzima sobre o amido reduz drasticamente a viscosidade do meio, sendo denominada uma enzima de liquefação, que se destina à produção de maltodextrinas e assim, o produto final desta enzima ainda não é essencialmente fermentescível.

As  $\alpha$ -amilases sintetizadas por *Bacillus licheniformis* estão entre as mais resistentes dentre todas as  $\alpha$ -amilases conhecidas, por conseguinte, são classificadas como termoestáveis.

A presente patente prevê que após este processo o material parcialmente hidrolisado é submetido à ação da enzima amiloglicosidase também conhecida como glicoamilase ou amilo-1,6-glicosidase. Esta enzima é uma enzima sacarificante comumente produzida por cepas do fungo *Aspergillus niger*, que hidrolisa completamente o amido em glicose a partir de uma extremidade não-redutora.

Esta enzima possui a capacidade de hidrolisar tanto ligações  $\alpha$  (1,4) quanto  $\alpha$  (1,6) do amido liquefeito e por este motivo é classificada como uma exoenzima. O resultado da conversão enzimática do amido pela amiloglicosidase é a sua transformação total em glicose.

De acordo com a presente tecnologia, ainda existe a possibilidade de se utilizar ácido e/ou enzima em associação em etapas distintas.

O amido é hidrolisado numa primeira etapa com ácido inorgânico, tais como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico e/ou outros ácidos. A otimização do processo laboratorial determinou como condições ideais de hidrólise: ácido clorídrico 1,0 mol/L a 1,38 mol/L para material seco a *in natura*, um tempo de 12 minutos e uma temperatura de 121°C. De acordo com a presente patente de invenção outras condições poderão ser utilizadas, tais como, concentração de ácido variando entre 0,2 a 10 mol/L, a temperatura de hidrólise pode variar entre 25 e 150 °C, e o tempo de reação pode variar entre alguns minutos a diversas horas. Esta etapa é chamada de sacarificação que, dependendo da natureza do ácido e/ou enzima, produz maior ou menor proporção de glicose, maltose ou dextrinas.

Para a hidrólise enzimática uma quantidade em massa do material seco a *in natura* de 30% a 80% em relação à massa do líquido de suspensão, tem seu pH ajustado para 5,0 a 8,5, recebe uma quantidade de enzima alfa-amilase termoestável equivalente a 0,2 a 4kg/kg de enzima/tonelada de material e a temperatura ajustada para uma temperatura que pode variar entre 40 e 105 °C por um tempo que pode variar de 20 minutos a 5 horas hora sob agitação

constante. Em seguida, o material tem sua temperatura ajustada para 25 a 70 °C, tem o seu pH ajustado para 3,0 a 8,0 e recebe uma quantidade equivalente de enzima amiloglucosidase equivalente a 0,2 a 2 kg de enzima/tonelada de material e o processo ocorre em 1 a 24 horas sob agitação constante.

5 Este processo de conversão ácido/enzima permite produzir açúcares fermentescíveis e preconiza o uso das enzimas anteriormente descritas sob condições especificadas na presente patente.

De acordo com a presente patente de invenção o caldo produzido rico em açúcares fermentescíveis, em particular, glicose pode ser concentrado utilizando evaporadores e/ou outro  
10 equipamento visando aumentar a concentração da fonte de carbono na solução.

#### Pré-Tratamento e Hidrólise do material fibroso

A fração fibrosa resultante da etapa de hidrólise do material amiláceo é essencialmente composto, de acordo com HOLLOWAY et al. (Dietary fiber and other constituents of some Tongan foods. Journal of Food Science, v. 50, p. 1756-1757, 1985) por pectina, hemicelulose,  
15 celulose e lignina. A presente invenção contempla a etapa de pré-tratamento e hidrólise do material fibroso com a finalidade de geração de açúcares fermentescíveis potenciais neste material conforme ilustram as figuras 1 e 2.

Segundo a presente patente, o pré-tratamento do material fibroso deve fornecer condições otimizadas para a ação enzimática subsequente, aumentando a porosidade dos  
20 fragmentos, reduzindo a cristalinidade do material, gerando açúcares fermentescíveis, evitando a perda de carboidratos por condições severas de processo, bem como evitando compostos que possam inibir a etapa de hidrólise e/ou de fermentação posterior a este processo.

Segundo a presente invenção, os meios físicos de pré-tratamento podem ser realizados por trituração mecânica, com o uso de moinho de facas, moinho de bolas ou moinho de martelo,  
25 por exemplo, para posteriormente encaminhar um material de menor granulometria, com aproximadamente 0,1 a 0,8 mm de diâmetro e menos cristalino a um processo de tratamento posterior físico, químico ou biológico. Segundo a presente invenção, os tratamentos físico-químicos que podem ser usados igualmente no presente processo integrado são explosão à vapor, explosão de fibra com amônia, e explosão de CO<sub>2</sub>.

30 Na explosão a vapor o material fibroso de tubérculos é tratado com vapor saturado de alta pressão e em seguida é condicionado a uma queda brusca de pressão. Este processo normalmente ocorre em 100 - 300°C e 0,43-00,57 MPa, durante um período que pode variar de alguns segundos até alguns minutos.

O tratamento de explosão de fibra com amônia é realizado submetendo o material fibroso de tubérculos à amônia líquida em alta temperatura e sob elevada pressão, seguida de queda abrupta de temperatura. Normalmente, este processo utiliza cerca de 1 a 2kg de amônia líquida/ kg de material fibroso seco a uma temperatura de 60 a 120°C por um período de alguns minutos a uma hora.

A explosão a CO<sub>2</sub> usa em torno de 2 a 5 kg de CO<sub>2</sub>/kg de material fibroso sob pressão em torno de 5,00MPa por período que pode variar de alguns minutos à uma hora.

De acordo com a presente invenção, podem ser realizadas isoladamente ou em combinação com outras técnicas de pré-tratamentos com ácidos inorgânicos como o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dentre outros, concentrados ou diluídos em concentrações que podem variar de 0,1 mol/L até 5,0 mol/L em temperaturas que podem variar de 20 a 300°C durante um período que pode variar de alguns minutos a algumas horas. Ainda, a presente invenção contempla o uso de pré-tratamentos por via alcalina nas quais as condições de temperatura, concentração e tempo de reação equivalem ao pré-tratamento ácido utilizando-se de bases como hidróxido de sódio, amônia entre outros.

De acordo com a presente invenção, outra forma possível de pré tratamento é a exposição do material fibroso à peróxidos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado ou diluído em concentrações que podem variar de 1 a 6% em temperaturas entre 15 a 60°C em um período de 5 a 40 minutos.

Posteriormente, de acordo com a presente invenção, pode ser realizado um processo biológico catalizado por enzimas da classe hidrolases que preferencialmente são celulolíticas e/ou pectinolíticas no qual, o material residual do pré-tratamento é convertido a açúcares fermentescíveis. Segundo a presente invenção a hidrólise pode ser realizada com concentrações enzimáticas variando de 5 a 50 FPU/g de substrato em temperatura de 25 a 80°C, em pH que pode compreender entre 3,5 a 8,0 durante um período de 12 a 120 horas.

Como resultado desta etapa, constatou-se um grande potencial para obtenção de açúcares fermentescíveis como a glicose e a xilose, além do aproveitamento de uma fração que poderia ser um efluente sólido do processo.

#### Cepas de microrganismos oleaginosos utilizados

Os microrganismos utilizados na presente patente de invenção são, preferencialmente leveduras do grupo seguinte: *Candida curvata*, *Candida guilhermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida sp.*, *Candida oleophila*, *Candida lipolítica*, *Cryptococcus terricolus*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula ciferri*, *Lipomyces starkei*, *Rhodotorula gracilis*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*,

*Cladosporium fulvum*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor miehei*, *Penicillium gladioli*, *Penicillium javanicum*, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium spinulosum*, *Penicillium ultimum*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulans*, *Mortierrella hygrophila*, *M. zychae*, *M. elengata*, *M. parvispora*, *M. schumuckeri*, *M. alpina*, *Lipomyces lipofeer*, *Lipomyces tetrasporus*,  
 5 *Williopsis saturnus*, *Candida diddensiae*, *Yarrowia lipolitica*, *Trichosporon cutaneum* e, numa condição preferencial, *Rhodospiridium toruloides*.

#### Crescimento de *R. toruloides* em Diferentes Meios

O presente experimento teve por objetivo avaliar assimilação das fontes de carbono obtidas dos hidrolisados de mandioca e/ou outros tubérculos como a batata doce, bem como  
 10 estabelecer uma composição ideal em sais minerais e da fonte de nitrogênio visando maior produtividade em biomassa e lipídios. Tubérculos ricos em amido têm composição bastante variável, pois dependem de fatores agrícolas e industriais, tais como a variedade, o grau de maturação e as condições climáticas, dentre outras. Os principais componentes de um tubérculo são: água, carboidratos e fibras. O material, mandioca, foi obtido no comércio local e sua  
 15 composição apresenta 35% de amido. A presente invenção contempla o uso de material rico em amido, podendo estar seco, na forma de farinha e/ou peletizada, na forma *in natura* apresentando umidade original, bem como resíduos líquidos (manipueira e água de prensagem) e/ou sólido, na forma de bagaço, farelo, raspas, cascas, com umidades variáveis.

#### Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo, a cepa *R. toruloides* OF foi descongelada, repicada em meio  
 20 YM (Yeast Medium) sólido, e submetida ao crescimento em estufa a cerca de 30 °C durante 4 dias. Foi transferida em câmara de fluxo laminar para frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 300 mL do meio líquido YM estéril. Esses frascos foram transferidos para uma incubadora de movimento rotatório da TECNAL TE 421, em cerca de 30°C, 120 rpm por um período de 72  
 25 horas. O meio líquido YM é composto por glicose (10 g/L), peptona (5,0g/L), extrato de levedura (3,0 g/L), extrato de malte (3,0 g/L) e pH 5,0.

#### Triagem do meio de cultivo

Para otimização do meio de produção de biomassa microbiana rica em lipídios, foi empregado método estatístico de triagem Plackett Burman já referenciado em literatura por Li et  
 30 al. (Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 3613-3617, 2009). Esta otimização dos componentes do meio fermentativo é feita para maximizar produção de biomassa microbiana rica em lipídios. Aos hidrolisados de mandioca rico em glicose foram adicionados os

seguintes sais minerais:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  em diferentes concentrações. Como fontes de nitrogênio foram testadas: uréia, extrato de levedura, sulfato de amônio. Foram realizados 12 experimentos em frascos erlenmeyer com pH inicial de 5,5, temperatura de 30°C e agitação de 120rpm em incubadora de movimento rotatório da TECNAL

5 TE 421, durante 120 horas como descritos nas Tabelas 2 e 3. Em cada batelada, análises de biomassa e teor de lipídios foram realizadas a cada 24h. Um volume conhecido do mosto fermentado foi centrifugado a 5000 rpm, a fração líquida é submetida à análise dos açúcares reductores em glicose utilizando método do 3,5 ácido dinitrossalicílico (DNS). A biomassa microbiana foi lavada com água destilada e seca em estufa a temperatura de 100°C por 24

10 horas. A biomassa seca foi macerada com graal e pistilo, e a extração de lipídios realizada seguindo a metodologia descrita por FOLCH, J., LESS, M., STANLEY, S. (A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biological. Chemistry*, v. 226, p. 497-509, 1957). Os resultados foram analisados com o programa STATISTICA versão 5.0 da Statsoft®.

15

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental de triagem Plackett-Burmann:

Experimento	Fatores										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Tabela 3 - Matriz dos fatores, componentes e níveis do planejamento experimental de triagem Plackett-Burmann:

Fatores	Componente	Nível	
		-1	+1
A	$KH_2PO_4$	0	1,5g/L
B	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0	1,5g/L
C	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0	0,1g/L
D	$CaCl_2$	0	0,5g/L

E	ZnSO <sub>4</sub>	0	0,01g/L
F	Uréia	0	0,5g/L
G	Extrato de levedura	0	1,5g/L
H	Sulfato de Amônia	0	1,0g/L
I	Glicose	40g/L	100g/L
J	-	0	0
K	-	0	0

Obs: fatores J e K são neutros e citados apenas para fechar o planejamento.

Após análise estatística, a partir dos resultados na Tabela 4 é possível dizer com 95% de confiança que as variáveis A, B, D, F e G influenciam positivamente na produção de biomassa.

Tabela 4- Matriz dos resultados obtidos do planejamento experimental de triagem

5

Plackett-Burmann:

Experimento	Biomassa (g/L)	Lipídios (%)	Consumo de glicose (%)	pH final	Rendimento de lipídios (g/L)
1	9,64	24,97	10,85	4,5	<b>2,41</b>
2	9,10	24,52	14,18	4,16	<b>2,06</b>
3	7,41	36,39	20,26	5,01	<b>2,19</b>
4	9,35	26,54	32,45	5,12	<b>2,36</b>
5	9,75	36,08	49,33	5,19	<b>3,51</b>
6	8,98	20,68	45,46	4,15	<b>1,86</b>
7	10,94	20,57	18,05	4,35	<b>2,25</b>
8	8,78	15,8	25,52	4,14	<b>1,42</b>
9	8,85	30,31	45,73	4,25	<b>2,68</b>
10	9,79	20,44	15,83	4,79	<b>1,97</b>
11	10,00	25,99	37,16	4,52	<b>2,59</b>
12	7,05	39,55	43,25	4,85	<b>2,86</b>

A porcentagem de lipídios está relacionada estatisticamente com quantidade de biomassa formada ( $p > 0,05$ ). A mesma situação ocorre na avaliação do acúmulo de lipídios. Neste caso, a avaliação de Plackett-Burman mostra que as variáveis A, B, D e G são os fatores que influenciam o resultado positivamente.

10

O extrato de levedura se mostrou ser uma fonte de nitrogênio ideal, através deste planejamento, no entanto, a uréia é uma fonte de nitrogênio que pode ser utilizada igualmente na produção da biomassa microbiana, sem perdas importantes em seu rendimento. Desta forma, as próximas etapas de otimização foram conduzidas utilizando uréia como fonte de nitrogênio, como forma de reduzir custos do processo. Entretanto, outras fontes de nitrogênio poderão ser utilizadas na produção de biomassa microbiana rica em lipídios na produção de óleo combustível e/ou biodiesel a partir matérias primas amiláceas, e seus resíduos (líquidos ou sólidos).

15

Estabelecimento do meio de cultura de baixo custo para produção de biomassa microbiana rica em lipídios

A seleção e otimização de um meio de cultivo de baixo custo para produção de biomassa microbiana rica em lipídios foi realizada utilizando técnica do "Planejamento fatorial composto central" com triplicata no ponto central, conforme condições descritas nas Tabelas 5 e 6. Foram realizados 27 experimentos, sendo triplicata no ponto central em frascos erlenmeyer de 500 mL com pH inicial de 5,5, temperatura de 30°C e agitação de 120rpm em incubadora de movimento rotatório da TECNAL TE 421, durante 120 horas. Os métodos de análise foram efetuados da seguinte forma: um volume conhecido do mosto fermentado foi centrifugado a 5000 rpm, a fração líquida foi submetida à análise de açúcares redutores baseados no método 3,5 ácido dinitrossalicílico (DNS). A fração restante foi mantida em estufa de secagem por 24 horas a uma temperatura de 100°C, sua massa foi determinada como biomassa produzida em peso seco. A biomassa seca foi macerada com graal e pistilo, e a extração de lipídios realizada seguindo método de Folch (1957) onde são utilizados metanol e clorofórmio como solventes em um extrator do tipo Soxhlet. Os resultados foram analisados com o programa STATISTICA versão 5.0 da Statsoft®.

Tabela 5: Matriz do "Planejamento fatorial composto central" com triplicata no ponto central para otimização de um meio de cultivo.

Experimento	A	B	C	D
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0

19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25 (C)	0	0	0	0
26 (C)	0	0	0	0
27 (C)	0	0	0	0

Tabela 6 - Matriz dos fatores, componentes e níveis do "Planejamento fatorial composto central" com triplicata no ponto central para otimização de um meio de cultivo:

Fator:		Nível:				
		-2	-1	0	+1	+2
A	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25
B	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O (g/L)	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75
C	CaCl <sub>2</sub> (g/L)	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75
D	Uréia (g/L)	1,27	1,71	2,15	2,59	3,43

A tabela 7 contempla os resultados obtidos após a realização dos experimentos.

Tabela 7- Matriz dos resultados obtidos do "Planejamento fatorial composto central" com triplicata no ponto central para otimização de um meio de cultivo

5

Experimento	Biomassa g/L	% Lipídios	Conversão de açúcares (%)	Rendimento em lipídios (g/L)
1	9,65	34,24	23,27	3,30
2	9,98	26,16	38,67	2,61
3	11,97	20,15	37,71	2,41
4	9,87	30,63	45,55	3,02
5	9,71	28,32	35,37	2,74
6	10,10	30,01	24,65	3,03
7	9,96	34,21	25,33	3,38
8	10,20	33,57	37,02	3,42
9	10,03	31,83	26,71	3,19
10	10,45	30,14	21,08	3,15
11	11,17	25,06	38,40	2,80
12	10,34	21,45	15,02	2,22
13	11,12	14,28	26,03	1,59
14	9,29	19,45	13,92	1,80
15	11,28	14,99	9,93	1,69
16	9,99	15,67	15,71	1,57
17	10,67	23,28	20,11	2,48

18	10,68	21,54	33,31	<b>2,30</b>
19	11,46	23,70	24,37	<b>2,71</b>
20	10,11	21,45	14,61	<b>2,17</b>
21	9,50	23,12	34,27	<b>2,20</b>
22	10,28	19,14	14,61	<b>1,97</b>
23	10,03	20,00	35,23	<b>2,06</b>
24	10,09	19,46	34,27	<b>1,96</b>
25	10,56	24,78	42,93	<b>2,61</b>
26	10,65	25,01	42,15	<b>2,66</b>
27	10,49	23,15	42,91	<b>2,42</b>

Desta forma, após análise estatística, foi possível determinar composição de um meio de cultivo para produção biomassa microbiana oleaginosa, conforme descrito a seguir:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,50 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,30 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (0,30 g/L), uréia (1,77 g/L), Hidrolisado de Mandioca contendo Glicose na concentração de 75 a 80 g/L.

5 Segunda etapa- Produção de biomassa microbiana oleaginosa em biorreator do tipo  
batelada alimentada

O meio para inóculo do biorreator teve a composição idêntica semelhante ao utilizado para produção de biomassa microbiana rica em lipídios em termos da concentração e composição dos sais minerais e fonte de nitrogênio. Foi utilizada uma concentração da fonte de carbono de 40g/L glicose para o preparo de inóculo em frascos erlenmeyer de 1,0 L contendo um volume de 300 mL cada, pH inicial de 5,5, temperatura de 30°C e agitação de 120rpm em incubadora de movimento rotatório da TECNAL TE 421, durante 48 horas. O volume do inóculo corresponde a 12,5 % do volume final de trabalho da batelada alimentada.

A produção de biomassa da levedura oleaginosa em biorreator, ilustrada na Figura 3, foi conduzida durante 126 horas, em um equipamento da marca New Brunswick Scientific, modelo Bioflo 110, volume total de 14 L, volume de trabalho de 10L, módulo de controle de pH e de  $\text{O}_2$  com sonda  $\text{dO}_2$  Mettler Toledo InPro 6800 Series  $\text{O}_2$  Sensors e sonda de pH Mettler Toledo 425 mm modelo 405 DPAS-SC-K85/425 e duas bombas peristálticas para adição de antiespumantes e água, agitador mecânico com velocidade entre 100 – 1200 rpm, eixo de agitação com duas hélices de Rushton (6pás) de 74 mm, rotâmetro para controle de aeração range de 0 a 15L/min e escala de 1 em 1. Os parâmetros da fermentação foram temperatura de 30°C, pH 5,6, controlado pela adição de ácido fosfórico 5% e/ou hidróxido de sódio 3 normal,  $\text{dO}_2$  em 50%, velocidade entre 100 – 1200 rpm, controle automático conforme a saturação de oxigênio e variação de 1 vvm (5-10min) conforme volume de meio.

Nestas condições o microorganismo consome em poucas horas todo o açúcar disponível no meio de cultura. Após exaustão quase completa da fonte de nitrogênio, se busca fornecer as células apenas uma solução rica em glicose de hidrolisado de mandioca de aproximadamente 8 °Brix ou 80 g/L de açúcares fermentescíveis. Pulsos de alimentação de dessa solução de um volume de 1 litro são adicionados ao meio durante o processo fermentativo, conforme mostra o perfil cinético do processo descrito na Figura 5.

O perfil cinético da evolução de diferentes parâmetros durante produção de biomassa microbiana é apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Perfil cinético da produção de biomassa microbiana oleaginosa em biorreator.

Tempo (horas)	Glicose (g/L)	Biomassa (g/L)	Lipídios (%)	Produção de lipídios (g/L)
0	75	1,1	0	0
24	41,4	29,2	11,2	3,27
48	16,3	35,7	18,7	6,67
48,1	64,1	35,7	18,7	6,67
72	21,3	39,4	27,8	10,95
72,1	69,7	39,4	27,8	10,95
96	28,4	43,8	34,0	14,89
120	18,1	42,8	44,2	18,91
126	12,7	44,3	56,7	25,12

10 Terceira etapa - Etapa de cultivo algal utilizando recursos do processo integrado

As microalgas, quando cultivadas em meios adequados, podem duplicar sua biomassa em algumas horas. Tal característica, aliada à simplicidade nas técnicas de cultivo e a um metabolismo capaz de utilizar carbono inorgânico, torna as microalgas um dos objetos de interesse deste processo.

15 A presente invenção trata de um processo para produção de óleo combustível ou biodiesel, a partir do reaproveitamento do caldo centrifugado proveniente da produção de biomassa microbiana oleaginosa (CBM) e pelo reaproveitamento do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) gerado nesta fermentação. Além do uso do CBM como meio de cultivo para produção de biomassa algal está patente de invenção prevê também o uso de resíduos produzidos no  
20 processamento de tubérculos ricos em material amiláceo, manípueira, água de prensagem, conforme ilustrado nas figuras 1 e 4. Esses resíduos podem ser utilizados de forma isolada e/ou em associação. A biomassa algal rica em lipídios é recuperada por centrifugação ou floculação, podendo ser seca previamente ou não, sendo a mesma enviada para unidade de extração, transesterificação e produção de biodiesel. Esse processo de invenção permite redução

significativa ou completa da carga poluente oriunda do caldo e CO<sub>2</sub> gerados na etapa de produção de biomassa microbiana oleaginosa conforme demonstrado na figura 4., sendo esses resíduos utilizados na produção de biomassa algal oleaginosa, conforme descrito a seguir.

Adaptação da microalga *Chlorella vulgaris* OF ao caldo oriundo do processo de

5

produção de biomassa microbiana (CBM)

A microalga *Chlorella vulgaris* OF foi mantida em meio MBM, cuja descrição se encontra na tabela 9, antes de ser inoculada no caldo CBM.

Tabela 9 –Descrição dos componentes do meio MBM e suas concentrações .

Reagente	Quantidade (g/L)
KNO <sub>3</sub>	0,25
CaCl <sub>2</sub>	0,01
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175
NaCl	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02
H <sub>2</sub> O	-
Solução A5	1 mL

Foram realizados estudos da adaptação da microalga *Chlorella vulgaris* OF ao caldo  
 10 CBM proveniente da produção da biomassa de levedura oleaginosa. Também é possível realizar diferentes diluições do caldo fermentado com água ou meio sintético, de forma a permitir uma adaptação gradual da microalga a esse substrato. Esta adaptação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio. Os frascos foram transferidos para uma incubadora marca TECNAL, modelo TE-421, contendo fotoperíodo, temperatura e agitação  
 15 controladas.

Os cultivos foram incubados por um período de 17 dias, mantendo-se constantes os seguintes parâmetros: temperatura 30 °C ± 2 °C, agitação 110 rpm, 3500 Lux de intensidade de irradiação luminosa por períodos de 12 horas alternados com 12 horas no escuro. Para avaliação do crescimento de biomassa algal foram retiradas amostras nos dias 1, 3, 7, 12 e 17  
 20 de cultivo para análise por peso seco. A biomassa algal formada foi filtrada à vácuo em papel filtro de 50µm e em seguida lavada com água destilada e seca por 24 horas em estufa a 105°C

até peso constante, os resultados expressam a média de 3 determinações como descrito na tabela 10.

#### Preparo do Inóculo

De acordo com a presente invenção, o preparo do inóculo para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* OF pode ser realizado em diferentes modelos de frascos de vidros e/ou outro tipo de material transparente a luz. Esse processo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de caldo CBM ou uma mistura deste e água. Os frascos contendo esse meio de cultivo poderão ser ou não esterilizados. No caso desse experimento não foi realizado o processo de esterilização, sendo o mesmo inoculado com 30 mL de uma cultura ativa de microalga *Chlorella vulgaris* OF adaptada em meio contendo de caldo CBM e meio MBM, de modo que a concentração inicial de biomassa algal atinja valores de no mínimo a 0,20 g/L. Processos similares poderão ser realizados empregando concentrações de biomassa algal superiores e/ou inferiores a essa, utilizando adaptação prévia da microalga ao caldo CBM, manípueira ou água de prensagem da farinha de mandioca bem como, suas misturas, porém o objetivo é sempre se ter um inóculo viável e de boa qualidade para atender as necessidades da etapa seguinte do cultivo algal em um meio de cultivo à base do caldo CBM. Os frascos são transferidos para incubadora marca TECNAL, modelo TE-421 e cultivados nas mesmas condições descritas. A biomassa algal obtida foi empregada para inocular os fotobiorreatores nos experimentos posteriores.

#### Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* OF em caldo CBM

A microalga *Chlorella vulgaris* OF foi cultivada em caldo CBM como único meio de cultivo para produção de biomassa algal rica em lipídios. Foram utilizados fotobiorreatores tubulares com volume total de 2L.

Os fotobiorreatores foram preenchidos com 1,2L de caldo centrifugado proveniente da produção de levedura oleaginoso inoculados com 10% v/v de uma cultura ativa microalga *Chlorella vulgaris* OF de forma que a concentração no início do cultivo esteja por volta de 0,2 g/L de biomassa algal em cada fotobiorreator. A agitação e aeração dos fotobiorreatores foi realizada pela injeção contínua de 1 v/v/m (volume de gás por volume de meio por minuto) de ar enriquecido com 5% de CO<sub>2</sub> através de canículas de vidro com pedras porosas em sua extremidade como forma de melhorar a difusão dos gases no meio de cultura. Ar enriquecido com até 40% de CO<sub>2</sub> pode ser utilizado.

Os experimentos foram conduzidos em uma sala climatizada com temperatura controlada na faixa de 30 °C ( $\pm 2$  °C) através de uso de um condicionador de ar split, Marca

Cônsul Ambiense (12.000 BTU/h). Nessa sala foram instaladas duas estufas com foto-períodos para controle de tempo ciclométrico digital marca Full Gauge modelo PROGS I com alimentação direta de 220 VCA, contendo doze lâmpadas fluorescentes 20 Watts luz do dia, com dois reatores eletrônicos e uma tomada auxiliar de quatro pontos por prateleira, sistema de funcionamento automático e manual.

A iluminância dos fotobiorreatores foi de 3500 lux ( $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ) fornecida pelas lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia. Nesse experimento foi empregado foto-período de 12 horas, alternados com 12 horas de ambiente escuro. O tempo de cultura foi de 16 dias para todos os experimentos e diariamente água destilada foi adicionada para manter o volume de meio perdido por evaporação. A biomassa algal formada foi filtrada à vácuo em papel filtro de 50  $\mu\text{m}$ , em seguida lavada com água destilada e seca por 24 horas em estufa a 105°C.

Os resultados apresentados na tabela 10 representam a média de três determinações para uma mesma condição experimental no cultivo da *Chlorella vulgaris* OF em caldo CBM em fotobiorreator. A figura 6 ilustra o perfil da evolução de biomassa da *Chlorella vulgaris* OF em caldo CBM.

Tabela 10 – Perfil da evolução da biomassa e % lipídios no cultivo de *Chlorella vulgaris* OF em caldo proveniente da produção da biomassa de levedura oleaginosa (caldo CBM).

Tempo (dias)	Biomassa (g/L)	Lipídios %
0	0,2 ( $\pm 0,02$ )	-
3	0,35 ( $\pm 0,03$ )	2,25 ( $\pm 0,015$ )
7	0,59 ( $\pm 0,03$ )	5,28 ( $\pm 0,022$ )
12	1,22 ( $\pm 0,02$ )	9,63 ( $\pm 0,065$ )
17	1,52 ( $\pm 0,01$ )	14,00 ( $\pm 0,19$ )

Com relação ao acúmulo de lipídios, foi atingido um valor de 14% ( $\pm 0,19$ ) conforme demonstrado na tabela 10. Pelos resultados obtidos foi possível evidenciar que o caldo CBM puro se constitui em um substrato potencial para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*.

Rendimentos superiores e/ou inferiores aos apresentados nesse experimento poderão ser alcançados, caso sejam utilizadas outras amostras contendo misturas do caldo CBM com manipueira (M), água de prensagem de mandioca (APM) e/ou suas misturas. Assim como pelo emprego de resíduos (M, APM) provenientes de diferentes fecularias localizadas em diversas regiões do país. Variedades diferentes de mandioca, bem como quando do cultivo de outros gêneros e espécies de microalgas e/ou cianobactérias, assim como pelo emprego de diferentes modelos de fotobiorreatores (abertos e/ou fechados; agitados ou não; iluminação natural e/ou

artificialmente), assim como pelo cultivo em diferentes escalas de produção (laboratório, bancada, piloto ou industrial).

Análise de íons presentes no caldo CBM antes e após cultivo de microalga *C.*

*vulgaris* OF

5 A análise de composição e concentração de íons do caldo centrifugado proveniente da produção de levedura oleaginosa ion foram determinados em cromatógrafo 761 Compact IC 817 Bioscan.

Para a determinação de cátions, foi utilizada a coluna METROSEP C3 250/4.0 (Metrohm), 250 mL x 4,0 mm ID. As condições de análise foram as seguintes: 3,5 mM HNO<sub>3</sub>, 1,0 mL/min, 40°C, volume de amostra: 20 µL e 11,2 MPa. Um cromatograma padrão foi preparado com os seguintes sais: CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e NH<sub>4</sub>Cl. Todos os reagentes utilizados foram de padrão analítico (Sigma–Aldrich). Para a determinação de ânions, foi utilizada a coluna METROSEP A Supp 5 250/4.0 (Metrohm), 250mL x 4,0mmID. As condições de análise foram as seguintes: 3.2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,7 ml/min, 25°C, volume de amostra 20 µL, e 11,3MPa. Um cromatograma padrão foi preparado com os seguintes sais: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, NaF, NaNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e KBr. A tabela 11 demonstra que os ânions e cátions residuais presentes do caldo CBM se constituem num excelente aporte desses elementos para o cultivo algal.

20 Tabela 11: Concentração de ânions e cátions presentes no caldo CBM antes e após seu aproveitamento para cultivo algal.

Ânions/Cátions	Antes do cultivo algal	Após cultivo algal
	Concentração (mg/L)	
Fluoreto	0	0
Cloreto	33420,1	31378,48
Brometo	0	0
Nitrato	614,41	5,87
Fosfato	2938,84	903,80
Sulfato	1282,67	559,54
Amônio	1157,92	56,27
Magnésio	300,01	158,64

Cálcio	489,16	131,11
Sódio	12393,29	8893,31

De acordo com a presente invenção, foi constatado que os efluentes líquidos resultantes do presente processo integrado são meios de cultivo excelentes para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* OF por apresentar disponibilidade de nutrientes capazes de promover a produção de biomassa microalgal. Além disso, o caldo CBM após um primeiro cultivo poderá ser aproveitado para uma segunda e/ou terceira batelada de produção de biomassa algal, pois comporta ainda concentrações expressivas desses cátions e ânions. Outro aspecto importante desse processo de invenção está relacionado com as possibilidades de reciclar todo CO<sub>2</sub> gerado durante a produção da biomassa microbiana oleaginosa para os tanques de cultivo algal, conforme demonstrado nas figuras 3 e 4.

10

Análise da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) do caldo CBM após seu aproveitamento no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* OF.

A tabela 12 apresenta os valores obtidos da BDO e DQO presentes no caldo CBM e após o cultivo de biomassa microalgal. As metodologias utilizadas nas suas determinações foram fundamentadas em normas oficiais do Standard Methods of Analysis of Water and Wastewater de 2005.

15

Tabela 12: Concentração de ânions e cátions presentes no caldo CBM antes e após seu aproveitamento para cultivo algal.

Análise	DQO (mg/LO <sub>2</sub> )	DBO (mg/LO <sub>2</sub> )
Antes do cultivo algal	95.616,00	26.934,00
Após o cultivo algal	47.011,20	11.467,00

De acordo com a presente invenção o cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* OF proporciona uma redução expressiva nos valores de BDO e DQO do caldo CBM, permitindo assim uma aplicação racional e ecológica de todos os resíduos gerados neste processo integrado de invenção. Para se manter as mesmas taxas de produtividade em termos de biomassa algal alcançada no primeiro ciclo, efluentes do presente processo integrado poderão ser reutilizado em um 2º, 3º ou mais ciclos. Esses efluentes diluídos ou não, poderão ser suplementados e/ou não com sais minerais ricos em nitrogênio, fósforo, potássio, entre outros, como forma de compensar os macronutrientes e micronutrientes consumidos pela microalga no caso da realização de ciclo(s) precedente(s). Entretanto, um dos objetivos deste experimento foi

25

demonstrar o potencial de redução da carga poluente de efluentes líquidos gerados no presente processo através dessa tecnologia integrada.

De acordo com a presente invenção, ao fluxo de ar de alimentação dos fotobiorreatores pode ser misturado o gás CO<sub>2</sub> (em proporções volumétricas distintas) como forma de suprir com carbono mineral o meio de cultivo, favorecendo assim aumento do rendimento da produção de biomassa, bem como, acúmulo de lipídios durante o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* OF.

De acordo com a presente invenção tanto o caldo CBM pode ser formulado diluído em água e ou/não, misturado com manipueira e/ou não, com água de prensagem de farinha de mandioca ou não, formando assim misturas binárias ou ternárias desses efluentes.

De acordo com a presente patente o caldo de adaptação e/ou meio de cultivo microalgal pode ser composto pelo meio (EPS) descrito a seguir: KNO<sub>3</sub>(0,1g/L) 20mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0,01g/L) 20mL, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O(0,01g/L) 20mL, extrato de solo 30mL, solução de micronutrientes 5,0mL, água destilada 905mL e proteose-peptona 1mL, podendo ainda ser misturado o meio MBM em qualquer momento do processo.

De acordo com a presente invenção, microalgas e cianobactérias poderão também ser cultivadas em escala industrial. Diferentes formatos e tamanhos de tanques poderão ser utilizados, podendo ser abertos ou fechados, aerados ou não, agitados ou não, contínuos, semi-contínuos ou descontínuos, horizontais, verticais, do tipo raceway, de placas, tubulares, ovais, circulares, retangulares ou quadrados.

O cultivo de microalgas e/ou cianobactérias em reatores abertos é realizado em tanques naturais ou artificiais com volumes que podem variar entre algumas dezenas de litros até vários milhões de litros. Esses reatores ocupam grandes áreas, podendo atingir em média 10.000m<sup>2</sup> ou mais, no caso de um único tanque horizontal ou vertical. O sistema mais comum de agitação emprega pás, que são agitadas mecanicamente, sendo que ditas pás são distribuídas em espaços regulares por toda a superfície do meio, ou então localizadas nas extremidades ou no centro do reator. Em conjunto com a agitação por pás, pode ser injetado ar comprimido. Esse ar poderá ser filtrado ou não. Os reatores poderão ser fechados, através do uso de uma cobertura removível, porém essa cobertura deverá ser construída de um material transparente ou translúcido à luz natural ou artificial. Materiais mais apropriados são plástico, acrílico e vidro.

De acordo com a presente invenção, esse mesmo processo integrado ou metodologia poderá ser empregada para o cultivo de outros grupos de algas, microalgas e/ou cianobactérias, as quais poderão ser cultivadas de forma isolada e/ou em co-culturas (linhagens combinadas). Preferencialmente relacionamos como mais promissoras os gêneros e espécies a seguir:

*Euglena* sp. (*gracilis*), *Anabaena* sp. (*variabilis*, *cylindrica*, *hassali*, *planctonica*), *Dunaliella* sp. (*salina*, *bardawil*, *tertioleta*), *Achananthes orientalis*, *Amphora* (*delicatissima*, *cafeiformis*), *Ankistrodesmus falcatus*, *Chaetoceros* sp. (*muelleri*, *gracilis*, *muelleri subsalsum*), *Clorococcum* sp., *Chlorrella* sp. (*ellipsoidea*, *salina*), *Chromonas* sp. *Chrysosphaera* sp., *Cricophaera* sp.,  
 5 *Cryptomonas* sp., *Cyclotella* sp. (*meneghiniana*, *cryptica*), *Navícula* sp. *Amphiprora hyalina*, *Eustigmatophyte flagellate*, *Pleurochysis* sp., *Franceia* sp., *Gleocapsa* sp., *Gloeothamnion* sp., *Hymenomonas* sp., *Isochrysis aff. Galbana*, *Monoraphidium* sp., *Nannochloropsis* sp. (*salina*), *Navicula* (*saprophil*, *pseudotenelloides*, *biskanterae*, *acceptata*, *saprophila*, *pseudotenelloides*), *Nephrochloris* sp., *Nitzschia* sp. (*pusilla monoensis*, *elliptica*, *alexandrina*, *quadrangula*, *pusilla*  
 10 *monoensis*, *inconspicua*, *microcephala*, *frustulum*, *hantzchianna*, *intermédia*, *frustulum*, *communis*), *Ochromonas* sp., *Oocystis* sp. (*pusilla*), *Oscillatoria* sp. (*subborevis*, *limnetica*), *Phaeodactylum tricornutum*, *Platymonas* sp., *Pleurochrysis* sp. (*dentate*), *Prymnesiophyte* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Pyraminonas* sp., *Stichococcus* sp., *Synechococcus* sp., *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira weissflogii*, *Nitzschia* sp., bem como seus mutantes e/ou linhagens  
 15 modificadas geneticamente capazes de acumular lipídios em sua biomassa m concentrações importantes.

#### Quarta etapa - Etapa de recuperação do óleo da biomassa microbiana

A etapa de recuperação da biomassa microbiana, ilustrada nas Figuras 1 e 6, é realizada com o intuito de separar fração sólida da líquida. Esse processo é realizado através da  
 20 centrifugação em frascos de 500mL de capacidade a 4700 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante, de acordo com a presente patente de invenção poderá ser reutilizado no cultivo algal ou não.

A biomassa microbiana recuperada é lavada com água destilada e atacada com ácido clorídrico concentrado em uma proporção que pode variar de 0.1% a 10% em relação à  
 25 biomassa úmida. Essa biomassa é mantida aquecida a uma temperatura que pode ir de 50°C a 90°C por um período de 0 a 6 horas.

A biomassa hidrolisada é então submetida à uma nova centrifugação por 15 minutos a 5000 rpm e o óleo livre recuperado por filtração. Após este processo, a biomassa é resubmetida a um aquecimento de 70°C por 48 horas e o restante do óleo livre é recuperado por um funil de  
 30 separação. A biomassa restante é submetida a uma segunda extração com hexano em Soxhlet com condensador em um processo no qual o solvente orgânico arrasta a fração lipídica residual presente na biomassa microbiana. O solvente é então recuperado na quase sua totalidade

através de rotoevaporação a pressão reduzida. O residual de solvente é evaporado sob aquecimento de 70°C por 24 horas em estufa.

O óleo recuperado nas diferentes etapas pode ser ou não submetido ao branqueamento e degomagem. De acordo com a presente invenção, a biomassa residual, rica em proteína, pode ser destinada à alimentação animal como suplemento, conforme Figura 8. Outros métodos de extração (prensagem, solventes polares e apolares, álcalis, pirólise instantânea, entre outros) podem ser utilizados visando recuperar os lipídios estocados no interior das células microbianas e/ou na biomassa residual microbiana.

A extração dos lipídios foi realizada por extração com metanol e clorofórmio como descrito por Bligh&Dyer (Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911–917). A fração apolar foi solubilizada em solução hexano e água (volumes iguais), sendo os lipídios recuperados da fração hexano. A extração dos lipídios de biomassa algal foi realizado de maneira semelhante ao descrito acima.

#### 15 Análise dos lipídios (óleo) Microbiano e Algal

Os lipídios (óleos) obtidos a partir de biomassa microbiana de *R. toruloides* OF e *Chlorella vulgaris* OF foram analisados de acordo com a metodologia descrita a seguir:

Após a metilação de ácidos graxos presentes de acordo com descrito por Metcalfe, Smith & Pelka (Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Analytical Chemistry v. 38,p. 514-515,1966), as amostras foram submetidas à detecção e separação dos componentes utilizando a técnica de cromatografia (3 determinações) segundo American Oil Chemists Society (Cd 14c94). Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo da marca Varian (modelo 3300) equipado com detecção de chama e injetor do tipo "split/splitless" nas condições: Coluna Carbowax 20M, temperatura do detector de 270 °C e a do injetor de 250 °C. A programação foi determinada conforme segue: temperatura inicial = 165 °C (15 min.) e incremento de 5 °C /min. até temperatura final = 200 °C (6 min.). Gás de arraste hidrogênio ultrapuro, vazão 1,2 mL/min. a 30 psi.

A tabela 13 apresenta os valores de composição média de óleo produzido pela levedura oleagionosa *R. toruloides* OF e pela microalga *C. vulgaris* OF.

30 TABELA 13 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA LEVEDURA *R. toruloides* OF E  
MICROALGA *Chlorella vulgaris* OF

Carbono	Ácido Graxo	<i>R. toruloides</i> OF	<i>C. vulgaris</i> OF
		g/100g	g/100g

C14:0	mirístico	0,65	-
C15:0	pentadecanóico	0,21	-
C16:0	palmitico	19,12	39,32
C16:1	ômega 7 palmitoléico	1,48	-
C17:0	margárico	0,51	-
C17:1	cis-10-heptadecenóico	0,15	-
C18:0	esteárico	9,35	-
C18:1	ômega 9 trans elaídico	0,39	-
C18:1	ômega 9 oléico	50,32	28,67
C18:2	ômega 6 linoléico	8,70	31,99
C18:3	ômega 3 alfa linolênico	1,24	-
C20:0	araquídico	0,38	-
C20:1	ômega 11 cis-11-eicosenóico	0,14	-
C20:2	ômega 6 11,14 eicosadienóico	0,15	-
C22:0	behênico	0,54	-
C20:3	ômega 3 cis-11,14,17-eicosatrienóico	0,07	-
C24:0	lignocérico	0,99	-
Não identificado	Não identificado	0,61	0,02

Para complementar a caracterização dos lipídios (óleos) obtidos das biomassas microbiana e algal, parâmetros foram determinados seguindo a metodologia oficial da American Oil Chemists Society (2007) e apresentados na tabela 14.

TABELA 14 - DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIPÍDIOS (ÓLEOS)

5 OBTIDOS DA LEVEDURA *R. toruloides* OF E DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* OF

Ensaio/determinação:	<i>R. toruloides</i> OF	<i>C. vulgaris</i> OF
	Resultado	Resultado
Densidade Relativa (25°C) (g/cm <sup>3</sup> )	0,9118	0,9201
Índice de acidez (mg KOH/g)	46,0	46,0
Índice de iodo (cgI/g)	76	75,3
Índice de peróxido (meq/kg)	34,1	33,4
Índice de refração (25°C)	1,4659	1,5731
Índice de saponificação (mg KOH/g)	191,18	190,32
Matéria insaponificável (g/100g)	3,2	3,3

Quinta etapa - Transesterificação dos lipídios (óleos) Microbiano e Algal

A etapa de transesterificação, ilustrada na Figura 8, dos óleos microbiano e algal é realizada neste processo integrado tem por objetivo melhorar a qualidade de ignição, reduzir o ponto de fluidez e ainda ajustar a densidade e viscosidade para otimizar o seu aproveitamento em motores a ciclo diesel.

10

Seguindo Marchetti, Miguel & Errazu (Possible Method's for Biodiesel Production. Renewable & Sustainable Energy Reviews. v. 11, p.1300-1311, 2007), os ésteres etílicos e

metílicos foram obtidos através da reação de transesterificação realizada em frascos de 1 litro com tampa de alumínio dos óleos (lipídios) microbiano de *R. toruloides* OF e microalgal de *Chlorella vulgaris* OF na presença de etanol anidro (padrão analítico) e metanol (padrão analítico), em excesso estequiométrico, empregando o hidróxido de potássio (KOH) como catalisador para reação em meio básico. Foi empregada uma proporção molar etanol:óleo de 6:1 a 0,5% (m/m) de catalisador a uma temperatura de reação de 65 ( $\pm 2$ )°C por um tempo de 45 minutos para a rota metílica e 70( $\pm 2$ )°C por 45 minutos para a rota etílica sob agitação magnética constante. A fração residual de álcool foi eliminada do biodiesel, aquecendo-se o produto por 85°C durante 15 min.

Após esse período, o produto da reação foi transferido para um funil de separação. A fração superior (biodiesel) foi separada e lavada sob agitação com água destilada a temperatura 50°C, sendo a água removida aquecendo-se a uma temperatura próxima de 100°C.

A parte inferior, do funil de separação é constituída basicamente por glicerina que pode ser reincorporada ao processo (como única fonte de carbono e/ou em mistura com hidrolisado de mandioca e/ou batata doce) para produção de biomassa microbiana oleaginosa de levedura, integrando assim o ciclo de aproveitamento completo dos resíduos gerados nesse processo (figuras 1 e 3).

A presente invenção prevê ainda que a transesterificação dos óleos ( Lipídios), provenientes das sub-unidades de extração, possam ser transesterificados com o uso de etanol, isopropanol, butanol ou quaisquer outros álcoois primários, anidros ou hidratados ou suas misturas em quaisquer proporções estequiométricas de óleo em relação ao álcool. Ainda, a presente patente prevê que a reação de transesterificação dos lipídios microbiano e algal possam ocorrer em via ácida utilizando ácido sulfúrico, fosfórico e/ou outros. As temperaturas da reação que podem variar de 25 °C a 120 °C. A Figura 8 ilustra um fluxograma da etapa de transesterificação, parte integrante desse processo.

#### Avaliação da Qualidade dos Biodieseis Microbiano e Algal Produzidos

As tabelas 15 e 16 apresentam uma série de parâmetros analíticos dos biodieseis produzidos a partir da transesterificação dos lipídios da levedura *Rhodospordium toruloides* OF e da Microalga *Chlorella vulgaris* OF obtidos através da rota etílica e metílica.

TABELA 15 – ANÁLISES DOS BODIESEIS OBTIDOS A PARTIR DE LIPÍDIOS DA LEVEDURA OLEAGINOSA *Rhodospordium toruloides* OF

Ensaio	Método	Biodiesel obtido via transesterificação	Biodiesel obtido via transesterificação
--------	--------	---	---

		metilica	etilica
Massa específica a 20°C	ASTM D1298	880 kg/m <sup>3</sup>	888 kg/m <sup>3</sup>
Viscosidade cinemática a 40°C	ASTM D445	4,90 mm <sup>2</sup> /s	5,51 mm <sup>2</sup> /s
Água	ASTM 2709	380 mg/kg	410mg/kg
Contaminação total	EN 12662	3 mg/kg	3 mg/kg
Ponto de fulgor	ASTM D93	170 °C	170 °C
Resíduo de carbono em 100% de amostra	ASTMD189	0,01 %	0,01 %
Enxofre total	EN 14596	0 mg/kg	0 mg/kg
Fósforo	ASTM 4951	0 mg/kg	0 mg/kg
Teor de éster	EN 14103	>97 % de massa	>97 % de massa
Glicerina livre	EN 14105	0,01 % de massa	0,02 % de massa
Glicerina total	EN 14105	0,130 % de massa	0,165 % de massa
Monoglicerídeos	EN 14105	0,45 % de massa	0,40 % de massa
Diglicerídeos	EN 14105	0,17 % de massa	0,17 % de massa
Triglicerídeos	EN 14105	0,09 % de massa	0,09 % de massa
Metanol ou etanol	EN 14110	0,06 % de massa	0,07 % demassa
Estabilidade à oxidação a 110°C	EN 14112	>6 horas	>6 horas
Cinzas sulfatadas	ASTM D874	0,01 % de massa	0,01 % de massa
Índice de acidez	ASTM D664	0,1 mg KOH/g	0,14 mg KOH/g
Ponto de entupimento de filtro a frio	ASTM D2500	7 a 8	8 a 9
Índice de lodo	EN 14111	68	65
Poder calorífico (kcal/kg)	ASTM E711	9160	9150

TABELA 16 - ANÁLISES DOS BODIESEIS PRODUZIDOS A PARTIR DE ÓLEO DE MICROALGA *Chlorella vulgaris* OF

Ensaio	Método	Biodiesel obtido via transesterificação metilica	Biodiesel obtido via transesterificação etilica
Massa específica a 20°C	ASTM D1298	879 kg/m <sup>3</sup>	882 kg/m <sup>3</sup>
Viscosidade cinemática a 40°C	ASTM D445	4,99 mm <sup>2</sup> /s	5,68 mm <sup>2</sup> /s
Água	ASTM 2709	350 mg/kg	390mg/kg
Contaminação total	EN 12662	3 mg/kg	4 mg/kg

Ponto de fulgor	ASTM D93	165 °C	170 °C
Resíduo de carbono em 100% de amostra	ASTMD189	0,01 %	0,01 %
Enxofre total	EN 14596	0 mg/kg	0 mg/kg
Fósforo	ASTM 4951	0 mg/kg	0 mg/kg
Teor de éster	EN 14103	>97 % de massa	>97 % de massa
Glicerina livre	EN 14105	0,01 % de massa	0,02 % de massa
Glicerina total	EN 14105	0,140 % de massa	0,175 % de massa
Monoglicerídeos	EN 14105	0,48 % de massa	0,45 % de massa
Diglicerídeos	EN 14105	0,17 % de massa	0,17 % de massa
Triglicerídeos	EN 14105	0,09 % de massa	0,09 % de massa
Metanol ou etanol	EN 14110	0,06 % de massa	0,08 % de massa
Estabilidade à oxidação a 110°C	EN 14112	>6 horas	>6 horas
Cinzas sulfatadas	ASTM D874	0,01 % de massa	0,01 % de massa
Índice de acidez	ASTM D664	0,18 mg KOH/g	0,20 mg KOH/g
Ponto de entupimento de filtro a frio	ASTM D2500	7 a 8	8 a 9
Índice de lodo	EN 14111	70	72
Poder calorífico (kcal/kg)	ASTM E711	9180	9160

A tabela 17 apresenta as especificidades do biodiesel de acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis de acordo com a Resolução ANP Nº 7, DE 19.3.2008, bem como a European Norm EN 14214 e com a especificação da American Society for Testing and Materials ASTM 6751.

5

TABELA 17- ESPECIFICAÇÕES DE BIODIESEL DE ACORDO COM A ANP, EN E ASTM.

Ensaio	Especificação ANP (2008)	Especificação Europa EN 14214	Especificação EUA ASTM 6751
Massa específica a 20°C	850-900	-	-
Viscosidade cinemática a 40°C	3,0-6,0	3,5-5,0	1,9-6,0
Água	Máx. 500 mg/kg	Máx. 500 mg/kg	Máx. 0,05 % vol.
Contaminação total	Máx. 24 mg/kg	Max. 24 mg/kg	-
Ponto de fulgor	Mín. 100 °C	Mín. 101 °C	Mín. 130 °C
Resíduo de carbono em 100% de amostra	Máx. 0,05 %	Máx. 0,01 %	Máx. 0,05 %

Enxofre total	Máx. 50 mg/kg	Máx. 10 mg/kg	Máx. 0,05 %
Fósforo	Máx. 10 mg/kg	Máx. 10 mg/kg	Máx. 0,01 %
Teor de éster	Mín. 96,5 % de massa	Mín. 96,5 % de massa	-
Glicerina livre	-	Máx. 0,02% de massa	Máx. 0,02% de massa
Glicerina total	-	Máx. 0,25 % de massa	Máx. 0,24 % de massa
Monoglicerídeos	-	Máx. 0,8 % de massa	-
Diglicerídeos	-	Máx. 0,2 % de massa	-
Triglicerídeos	-	Máx. 0,2 % de massa	-
Metanol ou etanol	-	Máx. 0,2 %	Máx. 0,2 %
Estabilidade à oxidação a 110°C	Mín. 6 horas	Mín. 6 horas	Mín. 3 horas
Cinzas sulfatadas	Máx. 0,20 % de massa	Máx. 0,20 % de massa	Máx. 0,20 % de massa
Índice de acidez	Máx. 0,5 mg KOH/g	Máx. 0,5 mg KOH/g	Máx. 0,5 mg KOH/g
Ponto de entupimento de filtro a frio	Máx. 19	-	-
Índice de lodo	-	Máx. 120	-

Fica evidenciado que os biodieseis produzidos através dessa tecnologia integrada, apresentam uma especificidade abrangente no que diz respeito às várias normas aplicadas mundialmente para controle de qualidade desse biocombustível, podendo ser de acordo com a presente patente, utilizado de modo integral e/ou parcialmente com esse combustível fóssil em motores tipo Diesel. Outra possibilidade que se vislumbra com a presente tecnologia é utilizá-la como substituto aos biodieseis produzidos a partir de produtos agrícolas que são amplamente demandados na alimentação humana e animal, como a soja, por exemplo.

## REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, caracterizado pela utilização de fontes naturais de material amiláceo e subprodutos do processamento destes materiais, preferencialmente de mandioca e de batata-doce.

2. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender em sua forma integrada:

- uma etapa de preparação da matéria-prima para a obtenção de açúcares fermentescíveis ricos em glicose;

- uma etapa de produção de biomassa oleaginosa de microorganismos a partir de fontes naturais de material amiláceo e resíduos do processamento destes materiais, preferencialmente de mandioca e batata-doce;

- uma etapa de separação da biomassa obtida do caldo fermentativo;

- uma etapa de extração dos lipídios (óleos).

- uma etapa de transesterificação desses lipídios

3. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de a etapa de preparação da matéria-prima para a obtenção de açúcares fermentescíveis incluir:

- uma etapa de lavagem da raiz de tubérculo amiláceo utilizado, podendo ser mandioca e batata-doce;

- uma etapa de redução física de tamanho, podendo ser trituração e ralação;

- uma etapa de hidrólise, para obtenção dos açúcares fermentescíveis.

4. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes da fração amilácea e resíduos do seu processamento, compreender:

- uma etapa de hidrólise, podendo ser ácida, enzimática e um processo misto ácido-enzimático.

5. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de a manipueira e água de prensagem

gerada como resíduo deste processo poder ser utilizada como meio de cultivo microbiano ou algal.

5 6. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a etapa de obtenção de açúcares fermentescíveis através da hidrólise de material amiláceo e resíduos do seu processamento acontece com umidade variável, realizado a uma temperatura de 90°C a 150°C por 10 a 18 minutos, utilizando-se para cada 1 kg de matéria em base seca, de 3 a 8 litros de solução ácida diluída, preferencialmente ácido clorídrico diluído, tendo o pH ajustado após o processo de  
10 hidrólise.

7. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de que a etapa de produção de biomassa microbiana oleaginosa é realizada com o uso de pelo menos uma cepa dentre os  
15 microrganismos, escolhido do grupo consistindo de *Candida curvata*, *Candida guilhermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida sp.*, *Candida oleophila*, *Candida lipolítica*, *Cryptococcus terricolus*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula cifferri*, *Lipomyces starkei*, *Rhodotorula gracilis*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor miehei*, *Penicillium gladiololi*,  
20 *Penicillium javanicum*, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium spinulosum*, *Penicillium ultimum*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulans*, *Mortierella hygrophila*, *M. zychae*, *M. elengata*, *M. parvispora*, *M. schumuckeri*, *M. alpina*, *Lipomyces lipofeer*, *Lipomyces tetrasporus*, *Williopsis saturnus*, *Candida diddensiae*, *Yarrowia lipolitica*, *Trichosporon cutaneum*, bem como suas linhagens mutantes e geneticamente capazes de  
25 acumular lipídios em sua biomassa, preferencialmente da espécie *Rhodospiridium torulooides*.

8. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 7, caracterizado pelo fato de que a etapa de produção de biomassa microbiana oleaginosa é realizada utilizando açúcares fermentescíveis provenientes da fração  
30 amilácea e resíduos do seu processamento.

9. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de a biomassa microbiana oleaginosa ser produzida em

biorreator podendo ser constituído totalmente de vidro, plástico, aço inoxidável, aço carbono e outro material.

5 10. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de a biomassa microbiana oleaginosa ser produzida em biorreator podendo ser constituído parcialmente de vidro, plástico, aço inoxidável, aço carbono e outro material, incluindo qualquer combinação destes.

10 11. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações 2 e 9 ou 10, caracterizado pelo fato de a biomassa microbiana oleaginosa ser produzida em biorreator dotado de agitação mecânica em um tempo que pode variar de 24 horas a 240 horas, preferencialmente de 72 a 150 horas, em uma relação carbono/nitrogênio de 0,5 até de 500, preferencialmente entre 4 e 100, e, numa condição ainda mais preferencial, entre 30 e 80, em pH que pode variar de 2,0 até 9,0, preferencialmente de 4,0 a 6,0, e a uma temperatura  
15 na faixa de 10°C a 50°C, sendo o meio de cultivo aerado, incluindo ar e oxigênio, por um volume na faixa de 0,1 a 5 vvm (volume de ar e/ou oxigênio por volume de meio por minuto), podendo ser alimentado de uma a dez vezes por solvente, incluindo soluções aquosas, com concentração de açúcar fermentescível, incluindo glicose, de 10 g/L a 1000 g/L, preferencialmente de 200 a 600 g/L durante o processo.

20 12. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a produção de biomassa microbiana oleaginosa compreende:

- uma etapa para a preparação de pré-inóculo;
- 25 - uma etapa para a preparação de um meio de adaptação e propagação do inóculo.

13. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações 8, 9, 10 e 11, caracterizada pelo fato de que o meio de adaptação e propagação do inóculo compreende:

- 30 - de 20 a 60 g/L de açúcar fermentescível a partir da hidrólise de material amiláceo;
- de 0,1 a 0,6 g/L de uma fonte de fósforo e potássio, incluindo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;
- de 0,1 a 0,6 g/L de uma fonte de magnésio, incluindo  $\text{MgSO}_4$ ;
- de 0,1 a 0,6 g/L de uma fonte de cálcio, incluindo  $\text{CaCl}_2$ ;

- de 1,0 a 2,0 g/L de uma fonte de nitrogênio, incluindo uréia.

14. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a biomassa oleaginosa é concentrada através de uma etapa de separação física, incluindo filtração, preferencialmente centrifugação, além de passar por um processo de rompimento celular para facilitar a extração do óleo produzido através do fornecimento de calor em meio ácido.

15. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a fração aquosa residual da fermentação poderá compor novo meio de fermentação para diversos processos biotecnológicos, incluindo produção de biomassa microbiana oleaginosa em um novo ciclo.

16. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações 2, 4, 5, 6 ou 15, caracterizado pelo fato de o resíduo sólido proveniente das etapas de extração de óleo da biomassa microbiana poder ser utilizado como ração animal incluindo aditivos para ração animal.

17. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de compreender uma etapa alternativa para o cultivo de microalgas e/ou cianobactérias em processo integrado, utilizando como meio de cultivo efluente líquido e gasoso (CO<sub>2</sub>) proveniente da produção de biomassa microbiana oleaginosa.

18. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por compreender uma ou mais algas ou cianobactérias, cultivadas de forma isolada ou em co-culturas, dos gêneros e espécies que incluem *Euglena* sp (*gracilis*), *Anabaena* sp (*variabilis*, *cylindrica*, *hassali*, *planctonica*), *Dunaliella* (sp., *salina*, *bardawil*, *tertioleta*), *Botryococcus braunii*, *Achananthes orientalis*, *Amphora* (*delicatissima*, *cafeiformis*), *Ankistrodesmus falcatus*, *Chaetoceros* sp. (*muelleri*, *gracilis*, *muelleri subsalsum*), *Clorococcum* sp., *Chlorrella* sp. (*ellipsoidea*, *salina*), *Chromonas* sp., *Chrysosphaera* sp., *Cricophaera* sp., *Cryptomonas* sp., *Cyclotella* sp. (*meneghiniana*, *cryptica*), *Navícula* sp., *Amphiprora hyalina*, *Eustigmatophyte flagellate*, *Pleurochysis* sp., *Franceia* sp., *Gleocapsa* sp., *Gloeothamnion* sp., *Hymenomonas* sp., *Isochrysis aff. Galbana*, *Monoraphidium* sp., *Nannochloropsis* sp. (*salina*),

*Navícula (saprophil, pseudotenelloides, biskanterae, acceptata, saprophila, pseudotenelloides), Nephrochloris sp., Nitzschia sp., (pusilla monoensis, elliptica, alexandrina, quadrangula, pusilla monoensis, inconspicua, microcephala, frustulum, hantzchianna, intermédia, frustulum, communis), Ochromonas sp., Oocystis sp. (pusilla), Oscillatoria sp. (subborevis, limnetica),*  
5 *Phaeodactylum tricornutum, Platymonas sp., Pleurochrysis sp. (dentate), Prymnesiophyte sp., Pseudoanabaena sp., Pyraminonas sp., Stichococcus sp., Synechococcus sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii, Nitzschia sp.,* dentre outros gêneros e espécies.

19. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com  
10 as reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de os lipídios extraídos da biomassa oleaginosa microbiana e algal serem transesterificados para a produção de biodiesel segundo um processo em que o glicerol produzido na transesterificação poderá ser reincorporado (integral ou parcialmente) como fonte de carbono em outra fermentação para diversos processos biotecnológicos, incluindo a produção de biomassa microbiana oleaginosa.

15 20. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de os lipídios/óleos extraídos da biomassa microbiana oleaginosa, algal e/ou cianobactérias, sendo adequados para utilização direta em motores e na geração de energia, incluindo vapor, em misturas com combustíveis fósseis brutos,  
20 incluindo os provenientes do refino e/ou craqueados para obtenção de frações de C2 – C10.

21. PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de os lipídios produzidos poderem ser utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos, lubrificantes e de combustíveis.

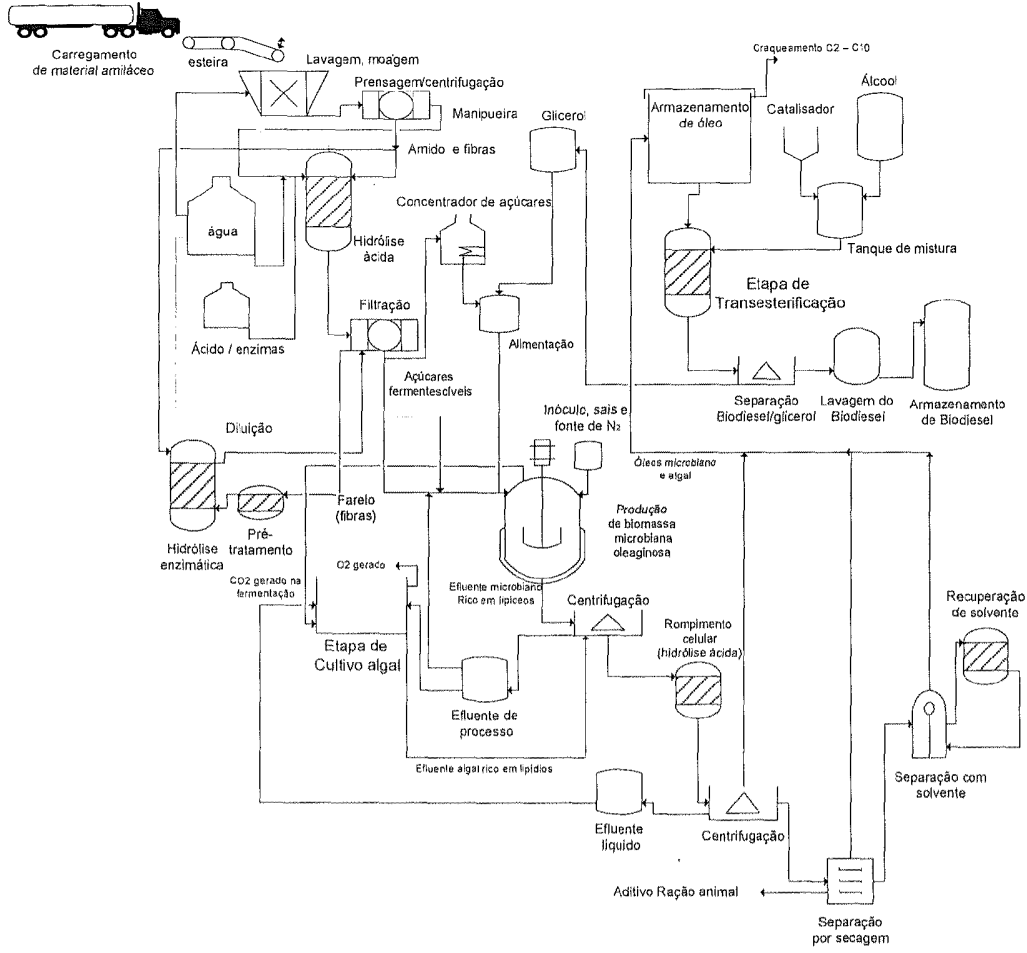


Figura 1

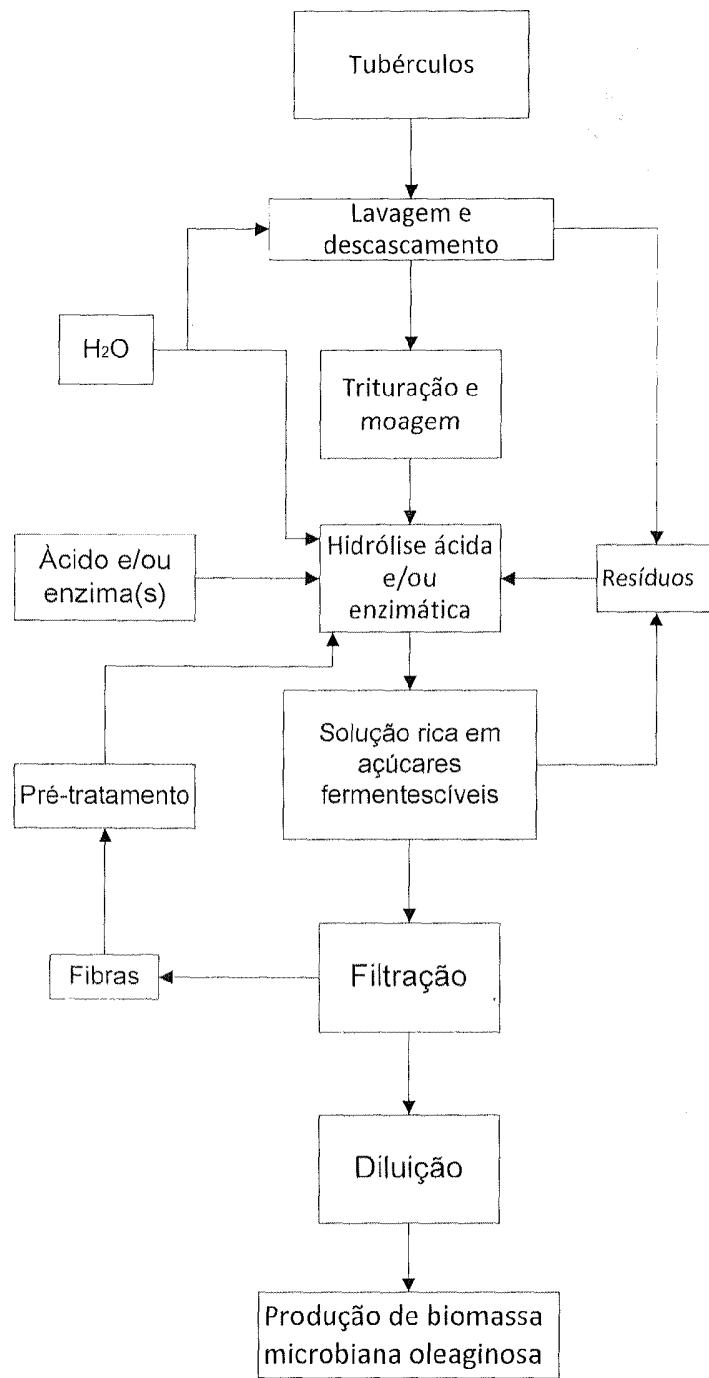


Figura 2

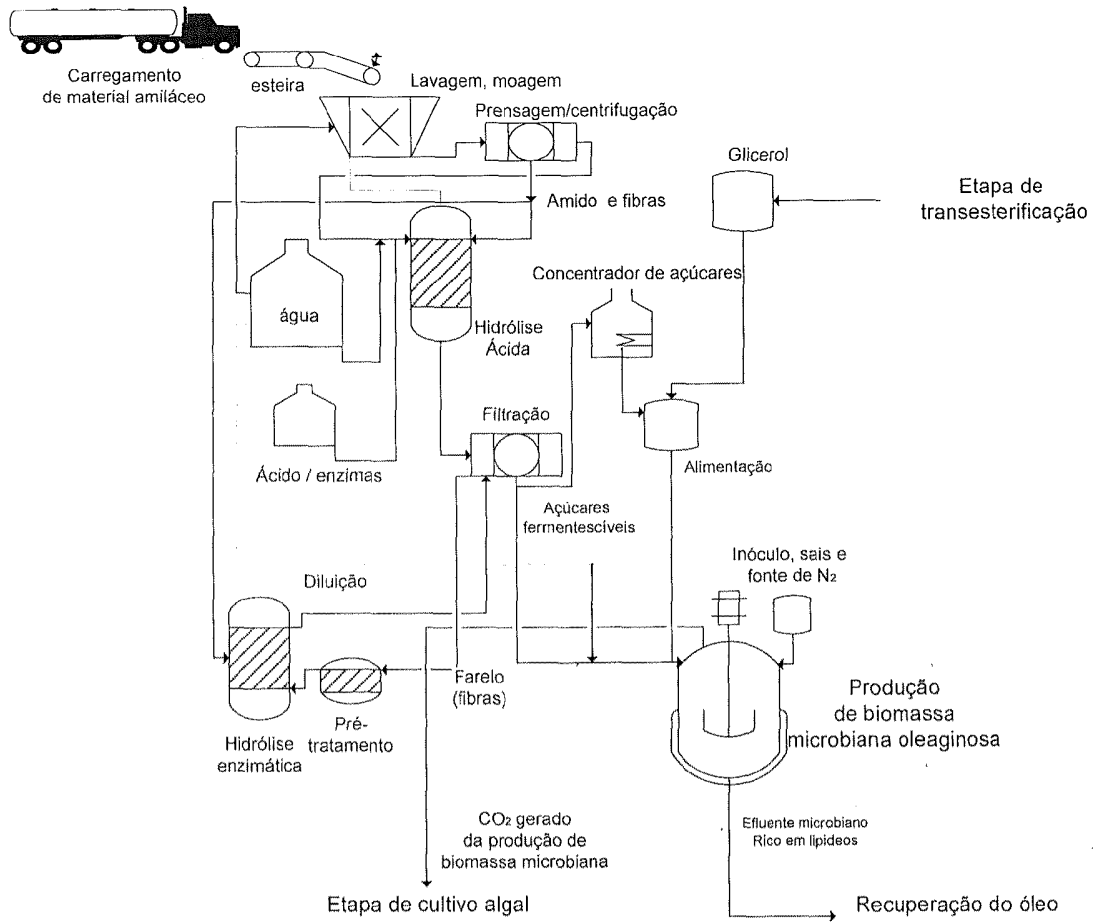


Figura 3

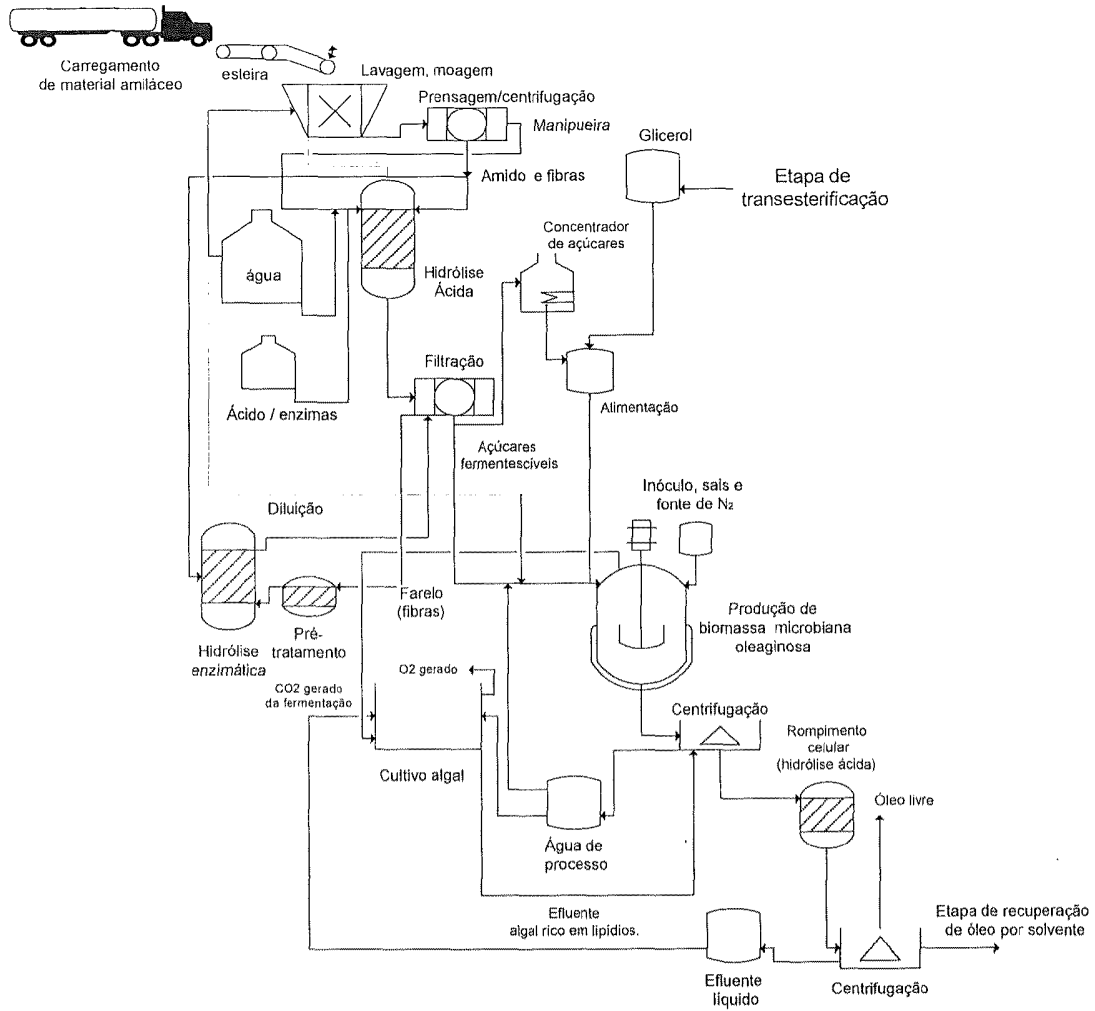


Figura 4

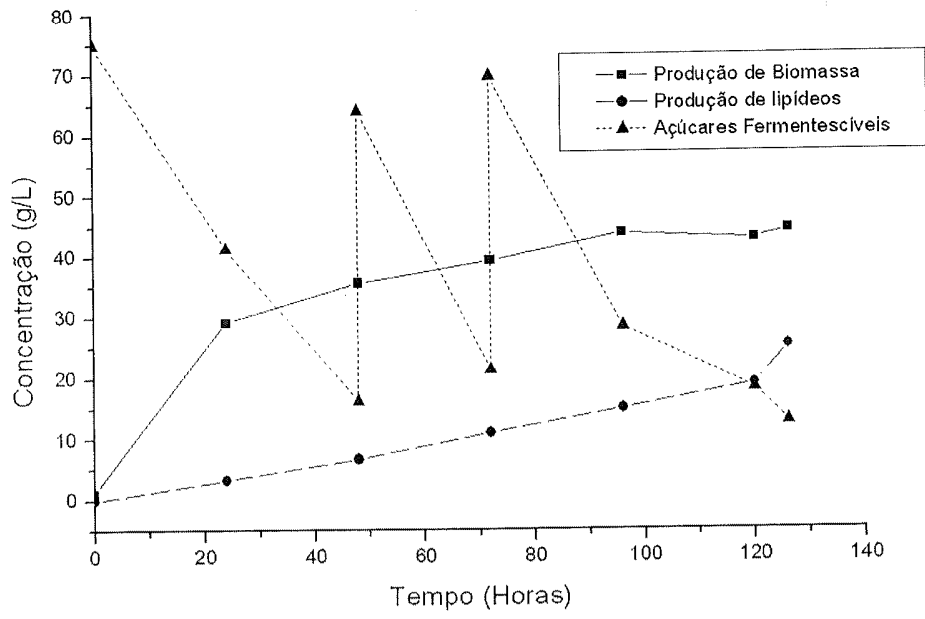


Figura 5

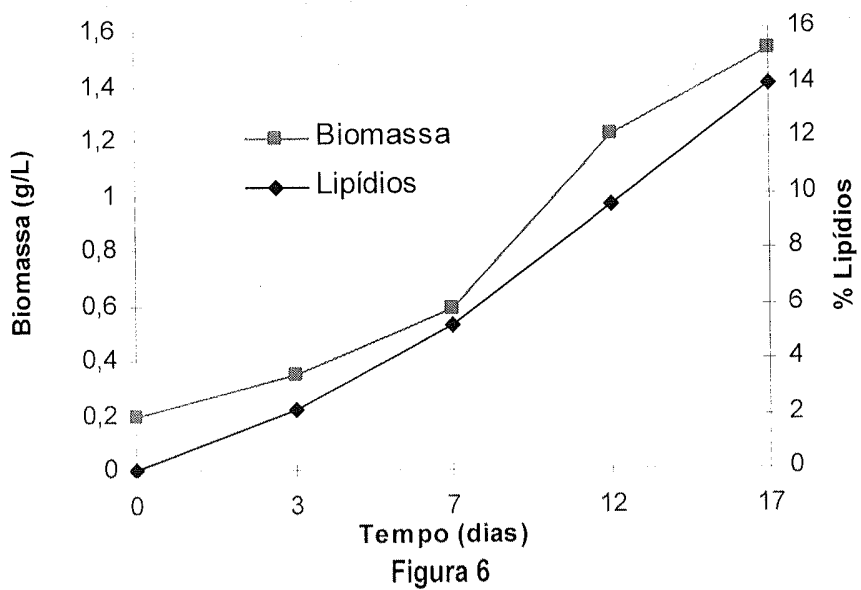


Figura 6

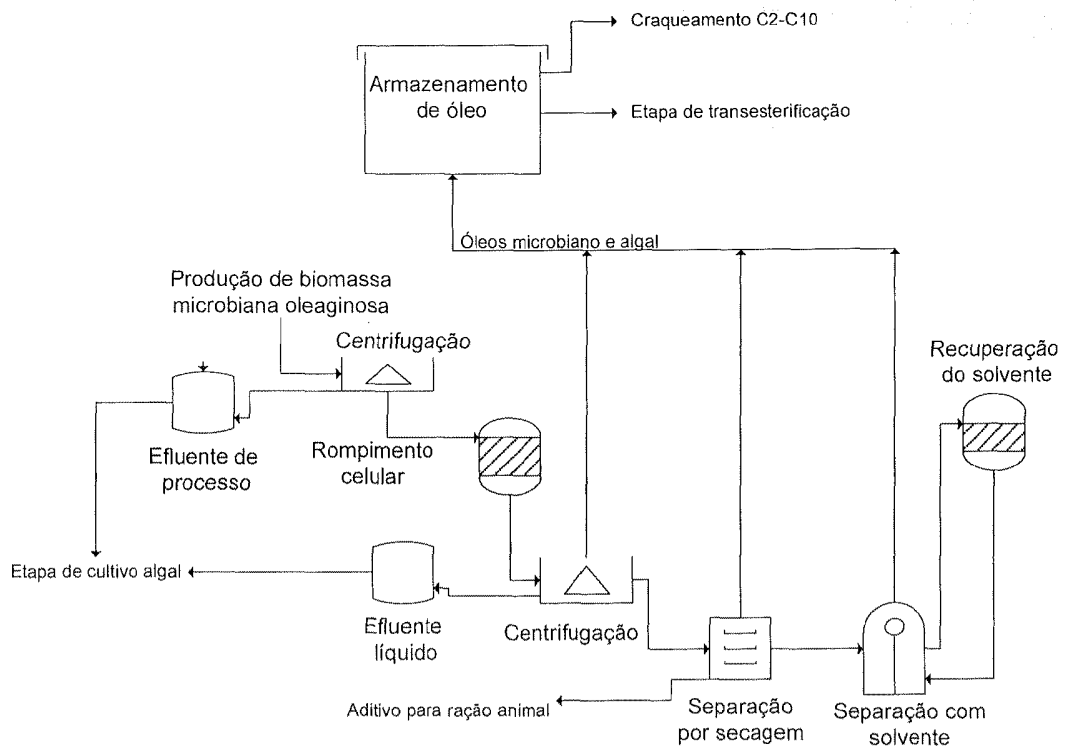


Figura 7

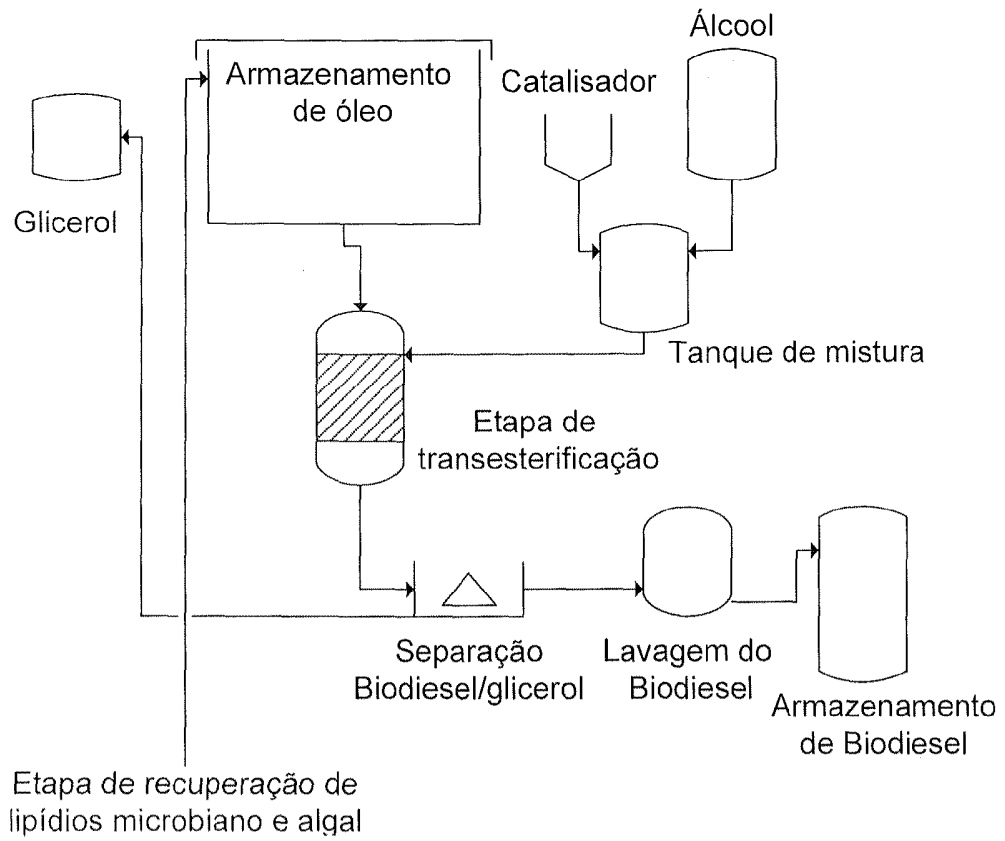


Figura 8

RESUMO**PROCESSO INTEGRADO PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS/ÓLEOS DE ORIGEM MICROBIANA E ALGAL A PARTIR DE TUBÉRCULOS AMILÁCEOS**

A presente invenção trata de um processo para a produção de biodiesel e/ou óleo  
5 combustível a partir de biomassa microbiana oleaginosa utilizando como substrato parcela  
hidrolisada de material amiláceo de tubérculos. Os produtos obtidos da presente invenção são  
adequados para utilização direta em motores e na geração de energia ou vapor e na alimentação  
humana, animal entre outros. O processo integrado segundo a presente invenção compreende a  
utilização de materiais ricos em amido para utilização como substrato (fonte de carbono) para  
10 produção de biomassa microbiana oleaginosa, em um processo no qual pode haver a  
reutilização do efluente gasoso (CO<sub>2</sub>) e do líquido residual da produção de biomassa microbiana  
em outro processo de produção de biomassa algal oleaginosa e/ou outro processo  
biotecnológico, bem como etapas de concentração, extração e transesterificação dos  
lipídios contidos na biomassa, com possível reutilização do glicerol residual. O processo  
15 descrito trata de uma tecnologia inovadora e ecologicamente sustentável para produção  
de biocombustíveis e outros produtos de interesse comercial.