



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

(21) BR 102019009649-7 A2



(22) Data do Depósito: 13/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

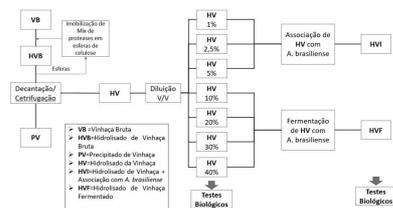
(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E USO DO FERTILIZANTE OBTIDO

(51) Int. Cl.: C05F 5/00; C05F 11/08.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA; BIO4-SOLUÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.

(72) Inventor(es): MIGUEL DANIEL NOSEDA; ANDRÉ OLIVEIRA DOS SANTOS; JENIFER MOTA RODRIGUES; MARCELO CALIDE BARGA; LEONARDO MAGALHÃES CRUZ; MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA.

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E USO DO FERTILIZANTE OBTIDO A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de fertilizante orgânico composto a partir de vinhaça de arroz proveniente da produção de álcool de arroz. Para isso, o processo envolve a produção de um hidrolisado enzimático (HV) tendo como característica a presença de aminoácidos livres, valendo-se de imobilização enzimática (complexo enzimático de proteases) em matriz de celulose, para emprego ou comercialização total ou parcial, com finalidades de aplicação nas áreas de agronomia, engenharia florestal e biotecnologia. O hidrolisado enzimático pode também atuar como substrato em processos fermentativos, incorporando à composição do fertilizante, moléculas de interesse agrônômico, gerando um fertilizante enriquecido com fitormônios (HVF). Adicionalmente, o hidrolisado enzimático pode ser associado sinergicamente à um rizo-inoculante, composto por microrganismo promotor de crescimento vegetal (HVI). Os produtos resultantes do processo descrito nesta tecnologia podem atuar como fertilizante foliar, enraizador ou auxiliar de germinação.



## **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E USO DO FERTILIZANTE OBTIDO**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[1] A presente invenção se insere no campo da agronomia, mais precisamente na área da engenharia agrícola e descreve um processo de obtenção de fertilizante orgânico composto utilizando tecnologia verde, que se caracteriza pela reação enzimática de vinhaça oriunda de destilarias, especificamente aquelas que produzem álcool de arroz, para a produção de um fertilizante orgânico composto. Além disso, a presente invenção trata da obtenção de um hidrolisado enzimático (HV) obtido a partir de vinhaça de arroz, tendo como característica a presença de aminoácidos livres, valendo-se de imobilização enzimática (complexo enzimático de proteases) em matriz de celulose, para emprego ou comercialização total ou parcial, com finalidades de aplicação nas áreas de agronomia, engenharia florestal e biotecnologia. O hidrolisado enzimático pode também atuar como substrato em processos fermentativos, incorporando à composição do fertilizante, moléculas de interesse agrônomo, gerando um fertilizante enriquecido com fitormônios (HVF). Adicionalmente, o hidrolisado enzimático pode ser associado sinergicamente à um rizo-inoculante, composto por microrganismo promotor de crescimento vegetal (HVI). Os produtos resultantes do processo descrito nesta tecnologia podem atuar como fertilizante foliar, enraizador ou auxiliar de germinação.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[2] Dentre os principais custos envolvidos na produção de bioetanol e outras bio-commodities está o substrato, ou seja, a fonte de açúcares fermentescíveis. O uso de materiais mais econômicos no campo da energia, como resíduos derivados do processamento de alimentos, resíduos agrícolas ou florestais, agrega valor às cadeias

produtivas envolvidas e reduz possíveis impactos ambientais negativos (ALIBARDI et al., 2012).

[3] Anualmente, milhões de toneladas de subprodutos, derivados do processo de beneficiamento do arroz são desperdiçados, incluindo casca do arroz, farelo e grãos quebrados, imaturos ou descolorados (ABBAS e ANSUMALI, 2010). Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) o mercado mundial de arroz totalizou cerca de 745 milhões de toneladas em 2014, gerando cerca de 50 milhões de toneladas de farelo de arroz, 45 milhões de toneladas de grãos quebrados, 30 milhões de toneladas de grãos imaturos e 7 milhões de toneladas de grãos descoloridos. A fim de diminuir a perda dessas frações que não chegam à mesa do consumidor, esse substrato passou a ser utilizado na indústria alcooleira, para produção de bioetanol, no entanto, um novo resíduo ou subproduto foi gerado, denominado vinhoto ou vinhaça.

[4] Segundo WILKIE et al. (2000), a produção de etanol a partir de plantações de açúcar (beterraba, cana-de-açúcar, melado, etc.), amido (milho, trigo, arroz, mandioca, etc.) e/ou material celulósico (bagaço de cana, colheita e resíduos de madeira) produz um volume considerável de vinhaça. Em média, 10 a 15 litros de vinhaça são gerados por litro de etanol produzido, dependendo do equipamento da destilaria (CORTEZ et al., 1992). A composição e características das vinhaças são dependentes das matérias-primas utilizadas no processo de produção do álcool. Num processo de obtenção do álcool, via fermentação, o microrganismo converte os açúcares presentes na matéria prima utilizada, em álcool. Após a destilação do mosto fermentado, os açúcares foram consumidos em sua grande parte, no entanto, muitas outras moléculas, constituintes da matéria-prima, permanecem presentes, enriquecendo a vinhaça resultante. O arroz branco possui em média 8% de teor de proteínas, ao final do processo

de produção de álcool de arroz, a vinhaça resultante possuirá uma maior concentração de matéria orgânica do que a vinhaça convencional de cana-de-açúcar (pobre em proteínas).

[5] A vinhaça oriunda da produção de etanol ou bebidas fermentadas vem, por décadas, sendo usada como fertilizante ou adubo foliar no setor agrícola. Entretanto, há grandes problemas ambientais envolvidos na aplicação de vinhaça bruta diretamente ao solo. A vinhaça caracteriza-se por ser uma pasta marrom escura, de baixo pH (entre 3,5 – 5,0), odor forte, e alto conteúdo orgânico (COD: 50 a 150 g/L). Essas características a tornam um material altamente poluidor quando administrado de forma imprudente, podendo comprometer a qualidade do solo ou levar à salinização dos lençóis freáticos (DA SILVA. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi, v. 18, n. 1, 2014; España-Gamboa et al., 2011; WALISZEWSKI et al., 1997).

[6] Métodos alternativos vêm, constantemente, sendo estudados de forma a minimizar os impactos dos fertilizantes químicos. Com isso surgiram, como alternativas, os fertilizantes naturais, orgânicos ou organominerais (DE SOUZA. Adubação no sistema orgânico de produção de hortaliças. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica, 2008). A vinhaça de arroz possui um alto teor protéico, e se tratada adequadamente pode conter índices reduzidos de matéria orgânica, pH adequado, e incluir moléculas de interesses agrícolas, como aminoácidos e fitormônios, podendo assim facilmente ser utilizada como fertilizante organomineral.

[7] A incorporação de moléculas de interesse agrônômico na vinhaça do arroz, como aminoácidos ou fitormônios, pode ser realizada por meio de processos bioquímicos, tais como processos enzimáticos e fermentativos, fazendo uso de catalizadores bioquímicos ou microrganismos, que resultem em modificações estratégicas no material

de interesse.

[8] O uso de enzimas proteolíticas imobilizadas para a obtenção de aminoácidos pode reduzir os custos do processamento da vinhaça. A imobilização enzimática é uma técnica simples e permite o manuseio conveniente de preparações enzimáticas.

[9] Alguns microrganismos endógenos têm apresentado capacidade de estimular o crescimento de plantas por mecanismos diretos (fixação de nitrogênio e/ou produção de fitormônios) e/ou mecanismos indiretos (antagonismo versus patógenos ou resistência a drogas) (SOUZA, 2001). No Brasil, os estudos têm sido conduzidos com linhagens de *Azospirillum brasilense* capazes de gerar ácido indol acético (AIA), uma auxina que pode atuar promovendo o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas, no entanto, esse efeito é dependente da concentração do hormônio presente (MADHAIYAN, SARAVANAN, et al 2004).

### **ESTADO DA TÉCNICA**

[10] São descritos no estado da arte alguns documentos de invenção que tratam da produção de fertilizantes que derivam ou contenham vinhaça em sua composição. Por exemplo:

[11] Os documentos PI 1100736-2 e BR132014019425-7 descrevem um melhoramento no sistema de tratamento de vinhaça com geração de energia através do uso de reatores anaeróbios (biogás), geração de água de reuso por evaporação e adubação orgânica ao final do processo. O bioproduto obtido é um adubo orgânico concentrado aplicado via fertirrigação. O sistema proposto envolve o uso de ultrafiltração e osmose reversa para diminuição dos sais presentes. É conhecido que membranas possuem alto custo e vida útil relativamente pequena devido ao entupimento dos poros, onerando significativamente o processo, tornando-o inviável em larga escala.

[12] O documento PI 1100645-5 se refere à transformação de vinhaça de cana-de-açúcar em adubo organomineral através de destoxificação de fenol e secagem por micronização da vinhaça para a utilização como fertilizante agrícola em geral. O processo engloba múltiplas etapas sequenciais, incluindo o uso de peneira molecular para concentrar em sólidos a vinhaça, seguida de secagem em equipamento do tipo moinho-micronizador-secador transformando-se em pó seco que, depois de devidamente acondicionados, pode ser utilizado como fertilizante agrícola. O produto final, um fertilizante organomineral, consiste de vinhaça concentrada e isenta de fenol, porém o processo não envolve nenhum tipo de melhoramento nutricional da vinhaça bruta.

[13] O documento KR20020089002 reivindica um fertilizante líquido contendo aceleradores de crescimento para plantas, constituído pela mistura de álcool de vinho de arroz (*Makgeolli*) adicionado de nutrientes essenciais (C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B e Si), numa proporção de 80:20 m%, com aplicação via solo. A tecnologia citada utiliza o próprio etanol de vinho de arroz como produto base e não relata o uso de quaisquer reações bioquímicas para formulação do produto final.

[14] O documento CN1107454 refere-se a um fertilizante orgânico de pulverização, contendo entre seus componentes extrato de levedura, vinagre de arroz, ácido fítico, amônia e água. Esse produto tem ação no funcionamento fisiológico das células das plantas, promovendo a divisão celular e melhorando o fitometabolismo. O mecanismo da invenção inclui extrair ribonucleotídeos a partir das células de levedura seguido de uma degradação dos produtos e posterior adição de vinagre de arroz, ácido fítico e amônia para fornecer nitrogênio, vitaminas, aminoácidos, minerais e nutrientes de açúcar para o crescimento e desenvolvimento das culturas.

[15] O documento PI 0401563-0 refere-se a um processo e equipamento para tratamento de vinhaça, resultante da produção de álcool e aguardente, visando a obtenção de um fertilizante organomineral sólido e a recuperação da água contida para aplicação industrial ou agrícola diretamente, ou potável após tratamento apropriado. Para tal, a invenção relata o uso de uma descarga elétrica para degradação do material orgânico da vinhaça seguido por um processo de secagem envolvendo troca de calor, gerando um produto concentrado contendo resíduos de material orgânico, podendo ou não ser adicionado de fertilizantes minerais.

[16] O documento CN104230604 descreve a produção de um fertilizante orgânico e inorgânico, constituído da mistura de melaço de cana e vinhaça de cana, fermentado de peixe, resíduos de avicultura e bovinocultura, bactérias fixadoras de nitrogênio, bactérias solubilizadoras de fósforo e potássio, um agente complexante de metal e sulfato ferroso. A tecnologia envolve múltiplas fermentações de melaço de cana, vinhaça de cana e resíduos de bovinocultura, por 12–48 h, utilizando bactérias aeróbicas, seguido por adição de fermentado de peixe e fermentações, por 12 – 36 h, utilizando bactérias anaeróbicas, só então o mosto final é pulverizado e adicionado de bactérias fixadoras de nitrogênio, bactérias solubilizadoras de fósforo e potássio. A utilização de múltiplas matérias-primas para a composição do produto final aumenta significativamente a dificuldade do processo em manter as características e qualidade nutricional do produto final, uma vez que o produto será dependente de diversas matérias-primas que, por sua vez, dependem de fatores externos, como é o caso do fermentado de peixe, resíduos de avicultura e bovinocultura.

[17] O documento JP2013112555, reivindica um processo para obtenção de um fertilizante, constituído de uma mistura de vinhaça de saquê não refinada (*Moromi*) ou vinagre de cereais, resíduos de

alimentos com teores de umidade superiores a 20% e terra de diatomáceas. O fertilizante obtido é misturado com o solo ou pulverizado de maneira convencional em culturas agrícolas. O uso de resíduos de alimentos caracteriza uma série de desvantagens ao processo, a composição nutricional do produto final é altamente variável e dependente dos resíduos disponíveis no momento, dificultando a manutenção da qualidade e características do produto final, além de um menor valor nutritivo, uma vez que os nutrientes presentes não se encontram em sua forma biodisponível para as plantas. Adicionalmente, metais pesados ou outros possíveis contaminantes químicos ou biológicos podem estar presentes, uma vez que processos adicionais de purificação/esterilização não são executados, podendo, a longo prazo, afetar adversamente o crescimento das plantas e o solo.

[18] O documento BR 112014031530-2 visa à proteção de um processo para o beneficiamento de vinhaça oriunda da produção de cerveja de milho, e recuperação de uma fração de sólidos com alto teor de proteína, uma fração de água suspensa e uma fração de óleo. A metodologia para o tratamento da vinhaça faz uso de um modo hidrotérmico (93,33 – 176,66 °C), alterando-se as propriedades físico-químicas da vinhaça. O pós-processamento dos produtos obtidos, com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade dos nutrientes, utilizando enzimas é citado, porém não é previsto o uso de imobilização enzimática, o que encarece o processo e indica que catalisadores ativos podem estar presentes no produto final.

[19] O estado da técnica, a respeito dos rejeitos derivados da produção de etanol ou biofermentados de arroz, é escasso. Embora os documentos citados evidenciem processos similares, a tecnologia processual coincide minimamente com o processo proposto na presente invenção, visto que não apresentam similaridade na matéria-

prima utilizada, tampouco fazem uso de enzimas imobilizadas conforme é reivindicado na presente invenção.

[20] A presente invenção faz uso do subproduto derivado do processo de produção de álcool de cereal, mais especificamente álcool de arroz, que tem características químicas diferentes das vinhaças derivadas do processo de produção dos "vinhos de arroz" tradicionais, ou vinhaças derivadas de outras matérias-primas. As propriedades nutricionais e químicas das vinhaças são dependentes da matéria-prima que as origina, bem como são afetadas pelos processos a qual são submetidas. De modo geral, as tecnologias descritas no estado da técnica, utilizam vinhaças provenientes de culturas ricas em carboidratos e pobres em termos de proteínas e aminoácidos, não oferecendo assim, grandes vantagens nutricionais aos fertilizantes produzidos. Vinhaças oriundas da produção de vinhos de arroz (saquê), cuja produção envolve fermentação paralela múltipla (sacarificação simultânea à fermentação) do arroz, apresentam características nutricionais diferentes a vinhaça de arroz tradicional, uma vez que em sua composição estão presentes ainda, além da massa de arroz residual, fungos (*Aspergillus oryzae*) e leveduras, e outros constituintes do vinho de arroz.

[21] As invenções descritas no estado da técnica, embora citem tecnologias que fazem uso de enzimas, não citam o uso de enzimas imobilizadas. O uso de enzimas imobilizadas permite uma maior eficiência do processo em razão da melhor separação enzimática do produto, além de permitir minimizar o processamento do produto a jusante, tornando o processo rentável, viável e mais eficiente, características estas não abrangidas a partir de quaisquer outros tipos de processos. A presença de enzimas no produto final não é ecologicamente correta, já que catalizadores ativos serão descartados nos efluentes ou aplicados diretamente ao solo, gerando impactos

indesejáveis aos mananciais e biosferas locais. Adicionalmente, as tecnologias descritas no estado da técnica não mencionam a utilização de um complexo multienzimático que atue na mesma faixa de pH e temperatura. Assim, menor variedade e quantidade de aminoácidos serão liberados, limitando os resultados de promoção de crescimento, uma vez que estas variáveis estão diretamente correlacionadas aos resultados obtidos por biofertilizantes. As invenções descritas citam ainda técnicas químicas o que limita as ações no campo da agricultura orgânica e de patentes verdes. Muitas destas alternativas causam impactos nos solos e reservatórios hídricos.

[22] A grande maioria dos documentos listados no estado da técnica envolvem apenas processos para concentração e secagem da vinhaça, não citando quaisquer tratamentos bioquímicos que envolvam uma melhora nutricional do produto final. É conhecido o alto valor nutricional da vinhaça, no entanto na sua forma bruta seus componentes não estão biodisponíveis. É necessário que a vinhaça seja submetida a diferentes tratamentos, de modo a gerar, converter e liberar componentes bioativos, bem como aumentar sua biodisponibilidade.

[23] Adicionalmente, os referidos documentos, apesar de indicarem fertilizante orgânico como produto final, não fazem menção da utilização de microrganismos associados para produção de fitormônios, objeto da presente invenção. Na ausência de moléculas promotoras de crescimento, as tecnologias atuais para a utilização da vinhaça acabam por não atingir resultados similares.

[24] Por fim, majoritariamente, as invenções não propõem fertilização via foliar, o que diminui a capacidade absorptiva das plantas.

[25] Cabe ressaltar ainda que até o presente momento não há relatos, no estado da técnica, do uso de um fertilizante orgânico

composto derivado de vinhaça de arroz. Os produtos compreendidos pela presente invenção são obtidos via hidrólise enzimática, utilizando um complexo enzimático de proteases imobilizadas em matriz de celulose, e sua posterior associação à um rizo-inoculante ou via fermentação, gerando produtos com capacidade bioestimulante que podem atuar como fertilizante foliar, enraizador ou auxiliar de germinação.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[26] A presente invenção tem por objeto propor um processo de obtenção de fertilizante orgânico composto a partir de vinhaça de arroz proveniente da produção de álcool de cereal, valendo-se de proteases imobilizadas para a clivagem das proteínas e consequente liberação de aminoácidos livres e peptídeos. Uma subsequente fermentação com um rizo-inoculante para a formação de pelo menos um fitormônio também é parte integrante e fundamental desta técnica, na obtenção de um produto alternativo ao obtido com a clivagem enzimática. O processo e produtos propostos neste documento reúnem diferentes características operacionais não reunidas anteriormente no estado da técnica, permitindo, entre outras coisas, uma utilização mais eficiente e econômica para a vinhaça de arroz, além da obtenção de um fertilizante organomineral rico em aminoácidos e peptídeos, podendo ainda conter fitormônios.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[27] A seguir, faz-se referência aos desenhos em anexo ao texto para melhor compreensão dos exemplos e concretizações apresentados:

[28] A FIG. 1 apresenta o fluxograma do processo de obtenção dos produtos fertilizantes orgânicos compostos oriundos de resíduos de álcool de arroz (HV, HVF e HVI);

[29] A FIG. 2 apresenta o fluxograma de obtenção do álcool de

arroz e geração dos subprodutos de vinhaça do arroz;

[30] A FIG. 3 apresenta um gráfico mostrando a comparação das atividades da enzima livre com as da enzima imobilizada e mostra seus respectivos percentuais de manutenção das atividades;

[31] A FIG. 4 apresenta um gráfico mostrando a cinética dos ciclos e teores de proteínas remanescentes após cada ciclo enzimático, sendo o ponto 0 uma solução de caseína fresca;

[32] A FIG. 5 apresenta gráficos mostrando os ganhos agronômicos de raízes de milho (*Zea mays* L.) quando tratadas com hidrolisado de vinhaça de arroz (HV), em comparação ao controle positivo (produto comercial Aminosoil) e controle negativo (água purificada), onde a FIG. 5A mostra os ganhos no comprimento, a FIG. 5B mostra os ganhos no volume, e a FIG. 5C mostra os ganhos no diâmetro;

[33] A FIG. 6 apresenta gráficos mostrando os ganhos agronômicos de plantas de alface (*Lactuca sativa*) quando tratadas com hidrolisado de vinhaça de arroz (HV), hidrolisado de vinhaça de arroz associada ao *Azospirillum brasilense* (HVI) e hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF), onde a FIG. 6A mostra os ganhos na área foliar, a FIG. 6B mostra os ganhos no peso ea FIG. 6C mostra os ganhos no número de folhas;

[34] A FIG. 7 apresenta os ganhos agronômicos diretos nas folhas de alface (*Lactuca sativa*), expressos em área foliar, quando tratadas com hidrolisado de vinhaça de arroz (HV), hidrolisado de vinhaça de arroz associada ao *Azospirillum brasilense* (HVI) e hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF);

[35] A FIG. 8 apresenta gráficos mostrando os ganhos agronômicos de raízes de alface (*Lactuca sativa*) quando tratadas com hidrolisado de vinhaça de arroz (HV) e hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF), onde a FIG. 8A mostra os ganhos no comprimento, a FIG. 8B mostra os ganhos no volume e a FIG. 8C mostra os ganhos no

diâmetro;

[36] A FIG. 9 apresenta gráficos mostrando os ganhos agronômicos em sementes alface (*Lactuca sativa*) tratadas com hidrolisado de vinhaça de arroz (HV), hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF) e hidrolisado de vinhaça de arroz associada ao *Azospirillum brasilense* (HVI), onde a FIG. 9A mostra os ganhos no comprimento, a FIG. 9B mostra os ganhos em área foliar e a FIG. 9C mostra os ganhos em tamanho do hipocótilo.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[37] A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de fertilizante orgânico composto a partir de resíduo de álcool de arroz oriundo da transformação bioquímica da vinhaça residual formada durante a produção do álcool de arroz, enzimas imobilizadas e fermentação com microrganismo produtor de fitormônio. O referido processo, conforme representado pela FIG. 1, compreende as seguintes etapas:

- (a) Preparação da matéria-prima;
- (b) Ajuste do pH da suspensão de vinhaça de arroz;
- (c) Imobilização das proteases;
- (d) Digestão enzimática.

[38] As referidas etapas serão melhor detalhadas a seguir.

#### **(a) Preparação da matéria-prima**

[39] A matéria-prima utilizada na presente invenção é a vinhaça de arroz, obtida após fermentação dos grãos de arroz para produção de etanol (FIG. 2). As características da matéria-prima utilizada são fundamentais e podem interferir na geração do produto final. A vinhaça de arroz deve possuir entre 20– 60% de peso seco em proteínas, 0 – 15% de carboidratos totais, 0 – 15% de matéria fibrosa, 0,5– 5g de derivados de fósforo para cada 100g de peso seco de vinhaça. Adequações à matéria-prima podem ser incluídas a critério do

operador, como a substituição da vinhaça de arroz pela vinhaça de outras culturas proteicas, como vinhaça de soja, vinhaça de feijão ou vinhaças de cereais diversos que apresentem as características descritas acima.

(b) Ajuste do pH da suspensão de vinhaça de arroz

[40] A suspensão de vinhaça de arroz sofre ajuste do pH para uma faixa entre 5,5 – 8,5, preferencialmente entre 6,5 – 7,5. O ajuste do pH é dado com a utilização de agentes alcalinos, preferencialmente hidróxido de sódio ou agentes ácidos, preferencialmente ácido clorídrico. A utilização de algum desses compostos químicos pode ser suficiente, no entanto pode-se usar a combinação de dois ou mais tipos de compostos para o ajuste do pH.

(c) Imobilização das proteases

[41] A imobilização ocorre por meio de imersão da matriz porosa constituída de celulose tratada por até 24 h (sob agitação branda de 20 a 90 rpm, e pH na mesma faixa de estabilidade do complexo enzimático) em uma solução contendo um complexo enzimático de proteases do tipo endo- e exopeptidases, sendo preferencialmente uma protease de *Aspergillus oryzae*, Bromelina (EC 3.4.22.32) e Corolase H-PH (EC 3.4.21.61), com concentrações entre 0,01 – 0,2% m/v de modo a aumentar a eficiência do processo de hidrólise e conseqüentemente a produção de aminoácidos e peptídeos no meio (traduzido em teor de N para as plantas). Após a adsorção das enzimas na matriz porosa, a matriz porosa contendo enzimas é revestida por um biopolímero como quitosana, alginato ou carragenana, sendo preferencialmente quitosana, em concentração entre 0,5 – 3% m/v. A matriz porosa utilizada, preferencialmente é uma matriz celulósica, macroporosa, mas também pode-se incluir materiais poliméricos porosos, como quitina ou borracha, materiais naturais como madeira, carvão ativado, rochas, cerâmicas, desde de que sejam inertes. A matriz porosa é recuperada

por meio de uma peneira com aberturas de 8 a 18 mesh, podendo ser utilizadas até um máximo de 25 ciclos consecutivos.

(d) Digestão enzimática

[42] A suspensão de vinhaça de arroz é aquecida a uma faixa de temperatura entre 35 – 65°C, preferencialmente entre 45 – 55°C, para a digestão enzimática (hidrólise enzimática), por 1 a 24 horas, sob agitação mecânica de 50 – 300 rpm. Essa digestão enzimática é realizada por um conjunto de proteases que incluem endo- e exopeptidases, imobilizadas previamente em suporte poroso constituído de celulose tratada.

[43] Após as referidas etapas, a mistura é processada usando meios adequados de separação, tais como, coador de pano, papel filtro, sistema de filtração à vácuo, tela metálica, centrifugação ou decantação. Após a separação utiliza-se o sobrenadante (hidrolisado de vinhaça de arroz – HV) para o destino final que é a produção do fertilizante.

[44] O produto obtido ao final dos processos é composto dos produtos da hidrólise enzimática, tais como aminoácidos livres, oligopeptídeos e peptídeos. Esta matéria de origem protéica contém entre 10 – 25% do peso seco do material. Açúcares solúveis de 0 a 10% do peso seco do material. Fosfatos em geral e íons potássio, compreendem até 5% do peso seco final. Este produto de hidrólise pode ser utilizado em forma diluída, numa faixa de diluição entre 1 – 25% v/v do hidrolisado de vinhaça de arroz (HV) em água.

[45] A determinação do potencial uso como fertilizante foi realizado por meio de diferentes bioensaios *in vivo* e *in vitro*. Nos bioensaios, os produtos resultantes do processo foram diluídos, na proporção adequada para se chegar à concentração final estabelecida. Os resultados mostram que esse produto final deve ser diluído entre 2,5 – 10% v/v, tanto como uso para enraizador, fertilizante

foliar e auxiliar de germinação.

[46] Com o objetivo de aumentar as propriedades que resultam em ganhos agronômicos do hidrolisado de vinhaça (HV), em peso e área foliar, comprimento e diâmetro de raízes, este foi associado a um rizoinoculante, preferencialmente uma rizobactéria, compreendendo os gêneros *Azospirillum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, preferencialmente do gênero *Azospirillum*, preferencialmente a espécie *Azospirillum brasilense*. Esta associação pode também ocorrer através de um produto que contenha fitormônios oriundos de uma fermentação do hidrolisado com os microrganismos em questão. Para adequar o meio para as fermentações, é realizada diluição do hidrolisado de vinhaça de arroz (HV) em água, entre 1 a 50% v/v, preferencialmente 20% v/v. Adiciona-se uma fonte de carbono exógena, como melão de cana, glicose, sacarose, lactose ou maltose, entre 1,5 mg/L a 3g/L, preferencialmente 60 mg/L. Fontes adicionais de cloreto de amônio e fosfato de potássio podem ser adicionadas, podendo ser utilizado de 0,001 a 0,2M para o cloreto de amônio e 1mM a 0,1M para o fosfato de potássio. Inocula-se de 0,1 a 10% de inóculo, preferencialmente entre 0,5 e 2,5%, contendo  $1.0 \times 10^8$  células de rizobactéria, e realiza-se a fermentação por 10 a 36 h, preferencialmente entre 20 e 28 h, a uma temperatura de 25 a 35°C. Este fermentado deve ser diluído de 4 a 20 vezes, e aplicados na parte aérea das plantas, dando origem a um novo produto, o hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF).

[47] O microrganismo em questão também pode ser aplicado de forma exógena às raízes das plantas como inoculante, agindo sinergicamente ao produto HV na parte aérea das plantas. Testes realizados nesta invenção comprovaram que o sinergismo entre os dois materiais propulsiona o melhor desenvolvimento das plantas.

[48] A presente invenção é explicada em mais detalhes pelos

exemplos a seguir, porém não é limitada pelos mesmos, pois servem apenas para comprovar que o produto resultante da hidrólise enzimática e seus subprodutos são efetivos como fertilizante orgânico composto com capacidade de aumentar enraizamento (volume e comprimento de raízes), área foliar, peso seco de plantas, bem como atuar como auxiliar de germinação.

### **EXEMPLOS**

#### Exemplo 1: Processo de imobilização do complexo enzimático de proteases

[49] Esferas amorfas de celulose tratada constituem o suporte poroso utilizado na imobilização das enzimas. Diferentes complexos enzimáticos de proteases, como (a) Complexo HBTP: protease de *Aspergillus oryzae* (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.21.63), Bromelina (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.22.32), Corolase-H-pH (AB Enzymes, EC 3.4.21.61); (b) Complexo HP: Corolase-H-pH (AB Enzymes, EC 3.4.21.61), Papaína (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.22.2); (c) Complexo S7P: Savinase (Novozymes, EC 3.4.21.62), Corolase 7089 (AB Enzymes, EC 3.4.24.28), Papaína (Prozyn BioSolutions, EC 3.4.22.2) e (d) Complexo PE: Pronase E (Sigma Aldrich, EC 3.4.24.31), foram suspensos em tampão fosfato 0,1 M, numa concentração de 0,1 g/L de cada enzima (para Corolase-H-pH adicionou-se 100µL/L) e permaneceu em contato com 100g de suporte de imobilização para cada litro de solução, sob agitação branda, em temperatura de 15°C por 20 h. Seguidamente, as esferas foram secas em estufa com circulação de ar, sob temperatura branda de 30°C, para não ocorrer desnaturação, e revestidas com uma camada de quitosana 1% m/v. Testes laboratoriais confirmaram a eficácia do suporte. O suporte apresentou uma eficácia na manutenção da atividade enzimática de 61,4% (±15%), em relação a eficiência das enzimas livres (FIG. 3), além de apresentar bom rendimento de imobilização enzimática (70mg/g de suporte). Ensaio de

ciclos enzimáticos mostram que o suporte não apresentou queda significativa da atividade, mesmo após 10 ciclos consecutivos (FIG.4).

Exemplo 2: Obtenção do hidrolisado de vinhaça de arroz (HV)

[50] A vinhaça de arroz, após ajuste do pH para 7,0, utilizando NaOH 0,5M (aproximadamente 20 mL para cada litro de vinhaça) foi aquecida a 50°C para posterior etapa de hidrólise enzimática e possibilitar o uso das enzimas imobilizadas. Após, 10 gramas de suporte imobilizado com o complexo enzimático de proteases (Exemplo 1) por litro de vinhaça foi adicionado, permanecendo sob agitação de 120rpm, a 50°C por 24 h. Seguidamente, as esferas foram separadas da suspensão utilizando uma peneira mesh 12 e a vinhaça hidrolisada foi decantada. O sobrenadante foi separado, originando os produtos hidrolisados de vinhaça de arroz (HV).

[51] A quantificação de aminoácidos foi realizada em analisador automático de aminoácidos, modelo SYKAM S433D (Sykam GmbH) e a quantificação de triptofano foi realizada por HPLC-UV-Vis a 283 nm com coluna C18, adaptando metodologia descrita por Shekhian, *et al.* (2010). Foi possível observar a partir da Tabela 1, que o complexo enzimático HBTP gerou uma maior quantidade de aminoácidos ao final do processo de hidrólise enzimática, atingindo uma quantidade total de 388,4 µmol por grama de vinhaça hidrolisada.

Tabela 1: Quantificação de aminoácidos (Aas) com hidrolisados de vinhaça de arroz (HV), hidrolisados com diferentes complexos multienzimático (HBTP, HP, S7P e PE)

Aminoácido	HV-HBTP		HV-HP		HV-S7P		HV-PE	
	µmol /g	% Aas						
<b>ASP</b>	8,3	1,6	-	-	-	-	-	-
<b>THR</b>	24,5	4,7	17,2	5,1	-	-	3,7	4,7
<b>SER+GLU+P</b>	44,9	8,6	6,3	1,9	-	-	7,8	9,9

<b>RO</b>								
<b>GLY</b>	34,4	6,6	-	-	5,4	5,5	5,1	6,5
<b>ALA+CYS</b>	41,1	7,9	30,0	9,0	8,9	9,0	7,2	9,3
<b>VAL</b>	44,5	8,6	29,9	9,0	10,8	10,9	12,4	15,8
<b>MET</b>	16,4	3,2	21,0	6,3	4,6	4,6	-	-
<b>ILE</b>	27,0	5,2	19,2	5,8	8,3	8,4	4,8	6,1
<b>LEU</b>	38,1	7,3	21,9	6,6	10,8	11,0	6,6	8,5
<b>TYR</b>	24,1	4,6	25,9	7,8	6,0	6,0	4,8	6,1
<b>PHE</b>	23,5	4,5	19,1	5,7	12,6	12,8	3,7	4,7
<b>HIS</b>	37,3	7,2	35,8	10,7	6,4	6,5	5,0	6,4
<b>LYS</b>	24,3	4,7	15,1	4,5	6,3	6,3	5,0	6,4
<b>Σ</b>	388,4*	100,0	224,2*	100,0	80,1*	100,0	66,0*	100,0

\* Arginina, Glutamina, Asparagina e Triptofano não foram quantificados

[52] O valor obtido pelo complexo enzimático HBTP é 42,2%, 79,4% e 83% superior aos obtidos pelos complexos HP, S7P e PE, respectivamente, além de apresentar maior número de aminoácidos. Adicionalmente, foi possível observar que o complexo enzimático HBTP, gerou quantidade de triptofano superior aos obtidos pelos demais complexos, atingindo 117,3 µg/g de vinhaça, como pode ser observado na Tabela 2 a seguir, valor este pelo menos 23,6% maior que os resultados obtidos com os demais complexos. Por essas razões o hidrolisado de vinhaça de arroz (HV) obtido utilizando o complexo enzimático HBTP foi escolhido para realização dos testes biológicos descritos nesse documento.

Exemplo 3: Obtenção do hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado com *Azospirillum brasilense* (HVF)

[53] Objetivando a produção do fitormônio ácido indol acético (AIA), estirpes de *Azospirillum brasilense* (FP2) foram inoculadas em meio de crescimento composto contendo hidrolisado da vinhaça de arroz

(HV). Uma diluição de 20% v/v do hidrolisado da vinhaça de arroz em água purificada foi determinada para o crescimento da bactéria, adicionadas de fontes de nitrogênio 2,5% v/v (cloreto de amônio 0,02M) e fósforo 5% v/v (fosfato de potássio 5mM), e melação de cana como fonte de carbono (300mg/mL). *Azospirillum brasilense* foi inoculado em concentração de 1% v/v ( $10 \times 10^8$  células/mL), e a fermentação permaneceu por 24 h, agitação de 120 rpm, e temperatura de 30°C. O meio fermentado foi então decantado e o sobrenadante foi separado, originando o hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF).

[54] A quantificação de triptofano e ácido indol acético (AIA) foi realizada por HPLC-UV-Vis a 283 nm com coluna C18, pela metodologia de SHEIKHIAN, *et al.* (2010), e mostrada na Tabela 2.

Tabela 2: Quantificação de triptofano e AIA dos produtos HV obtidos com diferentes complexos multienzimáticos e do produto hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF) obtido com o complexo enzimático HBTP

Tratamentos	Triptofano ( $\mu\text{g/g}$ )	AIA ( $\mu\text{g/g}$ )
HV-HBTP	117,28 ( $\pm$ 15,07)	-
HV-HP	70,33 ( $\pm$ 0,05)	-
HV-S7P	63,24 ( $\pm$ 0,005)	-
HV-PE	89,57 ( $\pm$ 0,009)	-
HVF	7,88 ( $\pm$ 0,012)	1,46 ( $\pm$ 0,015)

[55] A partir da Tabela acima, foi possível observar baixas quantidades de triptofano (7,88  $\mu\text{g/g}$  de vinhaça) e a presença de 1,46  $\mu\text{g}$  de AIA por grama de vinhaça no produto hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF). Por outro lado não foi detectada presença de AIA nos diferentes hidrolisados de vinhaça de arroz sem fermentação. Esses dados indicam que parte do triptofano originalmente presente no hidrolisado de arroz (HV) foi utilizado como precursor do fitormônio AIA pelo microrganismo no produto HVF. O hidrolisado de vinhaça de arroz

fermentado (HVF) foi utilizado para realização dos testes biológicos descritos nesse documento.

Exemplo 4: Obtenção do hidrolisado de vinhaça de arroz em associação com o inoculante de *Azospirillum brasilense* (HVI)

[56] O produto hidrolisado da vinhaça de arroz (HV) pode ser utilizado com um inoculante em paralelo com o fertilizantefoliar. Para tanto, foi adicionado 20µL de uma solução contendo  $1,0 \times 10^8$  ou  $2,5 \times 10^8$  células/mL de *Azospirillum brasilense*, previamente crescidas em meio NFB (padrão) por 24h (tempo necessário para atingir densidade ótica de 1,0 a 600nm) e injetadas 5cm abaixo do hipocótilo das plantas recém brotadas.

Exemplo 5: Avaliação da capacidade de enraizamento de plantas de milho (*Zea mays* L.) em contato com os produtos HV e HVI

[57] Este experimento baseia-se na metodologia descrita por EGENER, T.; HUREK, T. (1999) de análise de enraizamento de sementes do arroz, adaptado para o milho. Sementes de milho (*Zea mays* L.), previamente lavadas e esterilizadas com hipoclorito de sódio (0,1% v/v), foram pré-germinadas em placas de Ágar-ágar (0,8% m/v) por 48 h a 30 °C. Seguidamente, as sementes de milho pré-germinadas foram transferidas para tubos contendo aproximadamente 25 g de esferas de polipropileno, e permaneceram por 7 dias em estufa incubadora, com fotoperíodo de 12 h, umidade e temperatura controladas. Neste experimento, as sementes foram ancoradas nas esferas de polipropileno para a simulação de um solo inerte, no interior de um tubo de ensaio e adicionados 10mL da solução de interesse, com potencial para estimular o enraizamento do milho.

[58] Foram testados o hidrolisado de vinhaça de arroz (HV) e o hidrolisado de vinhaça de arroz utilizado em associação com o inoculante de *Azospirillum brasilense* (HVI). O hidrolisado de vinhaça de arroz, HV, foi diluído para as concentrações 2,5% v/v e 10% v/v em água

purificada. Para obtenção do hidrolisado de vinhaça de arroz em associação com o microrganismo *Azospirillum brasilense* (HVI), as células viáveis do microrganismo, foram inoculadas a uma concentração de  $2,5 \times 10^8$  células por tratamento, aplicando-as em cima das sementes de milho. Água purificada foi utilizada como controle negativo, e um produto comercialmente disponível (Aminosoil®, Agrivalle) foi utilizado como controle positivo. Para cada experimento individualizado, foram realizadas 15 réplicas por tratamento, e 3 réplicas experimentais, de modo que os valores obtidos são uma média dos experimentos.

[59] A FIG. 5 mostra os resultados obtidos em relação ao comprimento (FIG. 5A), volume (FIG. 5B) e diâmetro (FIG. 5C) das raízes de milho quando utilizado o hidrolisado de vinhaça de arroz (HV). Observa-se que HV, obteve resultados superiores aos obtidos para o controle positivo, demonstrando melhores rendimentos de comprimento, volume e diâmetro das raízes de milho na concentração de 2,5% v/v, apresentando diferença estatística, com  $p < 0,001$ , para o controle negativo, em todos os parâmetros analisados. A aplicação do produto HVI, hidrolisado de vinhaça de arroz utilizado em associação com o inoculante de *Azospirillum brasilense* não mostrou bons resultados nas plantas de milho, nas concentrações analisadas.

Exemplo 6: Teste de crescimento de plantas de alface (*Lactuca sativa*) utilizando os produtos HV, HVF, HVI como fertilizantes foliares

[60] Para avaliar o potencial dos produtos derivados da vinhaça de arroz, como fertilizante foliar, foram realizados bioensaios com plantas de alface (*Lactuca sativa*). Para tanto, foram utilizados vasos de 1 L com volume equivalente de solo previamente autoclavado, para garantir a esterilização da microbiota natural e permitir a avaliação dos ganhos agrônômicos quando realizado com inoculação de *Azospirillum brasilense*. As plantas de alface foram fertilizadas, por meio de aplicação foliar, a cada 12 dias, a partir do 15º dia, com 1,5 mL/planta

dos produtos, assim como foram realizados os controles. O experimento foi realizado por 50 dias em casa de vegetação, com 5 réplicas para cada produto testado. Este teste objetivou avaliar o tamanho de área foliar das plantas, e o ganho em peso seco com a aplicação foliar.

[61] Para as plantas inoculadas com HVF e HVI, foi aplicado no solo 20µL de uma solução contendo *Azospirillum brasilense* a uma concentração de  $10 \times 10^8$  células/mL. Para os produtos HV e HVI foram testadas as concentrações de 1%, 2,5% e 5% v/v. O produto HVF foi diluído, primeiramente a 20% v/v, seguido por novas diluições para 4, 8 e 12 vezes em água purificada. Água purificada foi utilizada como controle negativo (TN), também foi avaliado um controle de inoculação sem adição de fertilizante (sigla TI). Como controle positivo, utilizou-se um produto comercialmente disponível (Liqui-Plex Bonder®, Alltech), em concentrações baixas (sigla TP) e altas (sigla TPH), conforme recomendação do fabricante. Adicionalmente, foram testados os efeitos da inoculação em ambos controles positivos (TPI e TPHI para as respectivas concentrações).

[62] Os resultados dos testes são mostrados nas FIGs.6 e 7.É possível observar um ganho em área foliar e peso seco para as formulações que utilizaram inoculação de *Azospirillum brasilense* (HVI) em relação ao hidrolisado de vinhaça de arroz (HV). Esses ganhos podem ser correlacionados aos ganhos, descritos na literatura, derivados pelo sinergismo entre o microrganismo e a rizosfera da planta de alface, como fixação de nitrogênio e produção de fitormônio. No entanto, este benefício, não pode ser creditado exclusivamente pela inoculação, visto que a testemunha inoculada (TI), tratada somente com água pós a inoculação, obteve resultados menos expressivos do que HV. Conclui-se então, que no produto HVI, as propriedades de composição do hidrolisado da vinhaça de arroz e da inoculação com o microrganismo, atuam em conjunto para o ganho de área foliar e peso

seco. No que diz respeito ao produto HVF, obteve-se resultados positivos utilizando uma fermentação prévia do hidrolisado de vinhaça de arroz e aplicando-a como fertilizante foliar, obtendo alguns ganhos superiores aos do HVI, como em peso seco de HVF 1:4 e HVF 1:8, confirmando assim, que a fermentação libera biomoléculas estimulantes para o crescimento vegetal (como comprovado no Exemplo 3). Para o HV, obteve-se uma melhor resposta com a concentração de 5%; para o produto HVI, a melhor resposta foi atingida com a concentração de 1%; e para o produto HVF, o melhor resultado foi atingido com a diluição 1:8. Assim, conclui-se com esse experimento, que os produtos HV, HVF e HVI, são eficazes na proposta de utilizá-los como fertilizantes foliares.

Exemplo 7: Teste de enraizamento de plantas de alface (*Lactuca sativa*) utilizando os produtos HV e HVF

[63] Este teste foi realizado para avaliar o potencial dos produtos HV e HVF como enraizadores para alface (*Lactuca sativa*). Para tanto, utilizou-se HV nas concentrações 5 e 10% v/v, e HVF foi diluído 4 e 8 vezes. Como controle negativo foi utilizado água, e como controle positivo um produto comercialmente disponível (Aminosoil, Agrivalle®). Os testes foram realizados em casa de vegetação, em plantadeiras com volume de 50mL cada poço, preenchidas com terra preta inerte. As plântulas foram tratadas com 0,5mL de cada tratamento após o quinto dia, onde houve o brotamento das sementes, até o trigésimo dia, com aplicações a cada 5 dias. As leituras de volume, comprimento e área das raízes, foram feitas em quintuplicatas para cada tratamento.

[64] A FIG. 8 mostra os resultados obtidos de volume (FIG. 8A), comprimento (FIG. 8B) e área (FIG. 8C) das raízes de alface quando utilizado o hidrolisado de vinhaça de arroz (HV) e hidrolisado de vinhaça de arroz fermentado (HVF). Observa-se que HV, obteve resultados superiores aos obtidos para o produto HVI e para o controle positivo,

demonstrado melhores ganhos de comprimento, volume e diâmetro das raízes de alface em ambas as concentrações analisadas, apresentando diferença estatística, com  $p < 0,001$ , para o controle negativo, em todos os parâmetros analisados. Os resultados mostram que HV também apresenta potencial como produto enraizador.

Exemplo 8: Testes de brotamento de sementes de alface (*Lactuca sativa*) com os produtos sHV, HVI e HVF

[65] Para avaliar a capacidade dos produtos obtidos na presente invenção como auxiliar de brotamento, foi realizado um experimento testando os produtos HV, HVF e HVI (em quintuplicata) em sementes de alface (*Lactuca sativa*). Para tanto, utilizou-se placas de Petri de 5cm, com seu interior recoberto por um disco de papel filtro. Para cada replicata/placa, foram acomodadas 10 sementes de alface e 3 mL de cada produto. O experimento foi conduzido em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 30 °C. Após 7 dias, as sementes foram analisadas em scanner específico WinRhizo, medindo-se o comprimento das raízes, o tamanho dos hipocótilos (primeira parte aérea das plântulas) e a porção de área foliar.

[66] A partir dos resultados mostrados na FIG. 9, foram observados ganhos agronômicos no que diz respeito a germinação de sementes de alface. Neste experimento, observa-se que o produto HV estimulou crescimento de plântulas de alface com resposta para comprimento da raiz e comprimento do hipocótilo (parte aérea da planta nos primeiros dias após o brotamento). HVF e HFV estimularam o tamanho dos hipocótilos e a porção de área foliar. No estágio inicial do crescimento vegetativo, as sementes utilizam a reserva energética para o crescimento do vegetal, no entanto, as condições de crescimento neste primeiro estágio podem contribuir para o melhor desempenho em produtividade. Desse modo, é possível concluir que produtos HV, HVI e

HVF também apresentam potencial como auxiliares de germinação.

[67] Assim, conforme observado, o alto teor de matéria orgânica total encontrada na vinhaça de arroz, contribui de forma direta no benefício da lavoura ou de forma indireta na microbiota do solo. No caso da vinhaça do álcool de arroz, esse teor de matéria orgânica total é enriquecido pela alta concentração de proteína da amostra, visto que o arroz possui umas das maiores cargas protéicas dentre todos os vegetais (7% no grão polido e entre 8 – 9% no grão integral). Essas proteínas são também de alto valor nutricional, contendo dezoito dos vinte aminoácidos. Portanto, quando se trata de proteínas do arroz presentes na vinhaça, é possível atribuir um caráter nutricional mais elevado ao fertilizante foliar, levando em consideração as vinhaças mais produzidas no mundo, principalmente as derivadas do álcool de cana-de-açúcar, milho e beterraba. As matérias primas utilizadas nestas fontes mais convencionais, além de não possuírem teor protéico elevado (exceto o milho), não possuem perfil de aminoácidos tão rico.

[68] Adicionalmente, a utilização da vinhaça oriunda do arroz apresenta outras vantagens em relação à vinhaça de cana de açúcar e a grande maioria das outras vinhaças. No que diz respeito ao teor de potássio, sua caracterização mostra teores significativamente menores aos da cana de açúcar. A presente invenção impõe uma diluição de todos os sais e íons presentes na vinhaça convencional, resultando assim em um impacto menos deletério ao meio ambiente (solo e lençol freático). A vinhaça de arroz contém mais de 60% m/m em proteínas que, quando hidrolisado com o objetivo de liberar aminoácidos, contém quantidades em excesso de matéria orgânica para a fertilização, sendo, dessa forma, necessárias diluições para atingir os efeitos desejáveis sem agredir o meio ambiente.

[69] A presente invenção faz uso de enzimas imobilizadas, com suportes de imobilização biodegradáveis, possibilitando a recuperação

destas enzimas. O processo de recuperação dessas enzimas confere uma característica ecologicamente responsável ao processo, uma vez que não produz efluentes com catalizadores livres no meio, e também por se apresentar como uma alternativa econômica mais viável, já que estes biocatalizadores são onerosos ao processo.

[70] Duas técnicas, não descritas em associação no estado da arte, são utilizadas na presente invenção para obtenção das enzimas imobilizadas utilizadas no processo: técnica de aprisionamento em matriz porosa, onde o suporte de imobilização é constituído de celulose tratada, altamente poroso, com a capacidade de adsorver enzimas sem alterações significativas em sua atividade; e técnica de envolvimento por membrana, onde após a adsorção das enzimas na matriz porosa, pela técnica anterior, a matriz é revestida por uma camada de polímero biodegradável. Esse revestimento confere estabilidade e longevidade à matriz, preservando sua integridade e com isso, aumentando o tempo de uso do suporte. Essas técnicas em associação conferem mais longevidade ao reuso enzimático e também pouco ou nenhum impacto biológico gerado pelo processo. Complementarmente, a utilização de um complexo enzimático de proteases, não descrito no estado da arte, permite hidrolisar mais eficientemente as proteínas presentes na vinhaça.

[71] O processo proposto faz também uso de um microrganismo (uma rizobactéria) para ser cultivado em fermentação no próprio hidrolisado de vinhaça (substrato), ou como inoculante paralelo ao produto formulado. São notórias as vantagens de se utilizar um inoculante, a literatura descreve vantagens como fixação de nitrogênio, melhoramento da resposta imune da planta, produção de fitormônios absorvidos na rizosfera do vegetal. Já a proposta de utilização destes microrganismos para fermentar o hidrolisado de vinhaça de arroz possibilita produção de fitormônios *ex-situ*, o que

garante que essas biomoléculas de interesse estejam presentes na aplicação. As atuais tecnologias não contemplam esse tipo de beneficiamento. Os fitormônios são moléculas que podem atuar de maneira a melhorar as funções imunes da planta, alongar as células vegetais promovendo crescimento do vegetal e também ativar sítios genéticos de fixação de nitrogênio.

[72] Assim, o processo da presente invenção é capaz de gerar produtos distintos no campo da nutrição vegetal, já que podem servir como enraizador, auxiliar de germinação e fertilizante foliar, enquanto as demais invenções não fornecem ao aplicador essas possibilidades.

[73] Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas visando aprimoramento do projeto sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Processo de obtenção de fertilizante orgânico composto, **caracterizado** pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- (a) Preparação da matéria-prima;
- (b) Ajuste do pH da suspensão de vinhaça de arroz;
- (c) Imobilização das proteases; e
- (d) Digestão enzimática.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o fertilizante ser obtido principalmente a partir da vinhaça de cereais, como vinhaça de arroz, vinhaça de soja, vinhaça de feijão, preferencialmente a partir de resíduo de álcool de arroz oriundo da transformação bioquímica da vinhaça residual formada durante a produção do álcool de arroz, enzimas imobilizadas e fermentação com microrganismo produtor de fitormônio.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a vinhaça de arroz possuir entre 20 – 60% de peso seco em proteínas, 0 – 15% de carboidratos totais, 0 – 15% de matéria fibrosa, 0,5 – 5 g de derivados de fósforo para cada 100 g de peso seco de vinhaça.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o pH da suspensão de vinhaça de arroz ser ajustado para uma faixa entre 5,5 – 8,5, preferencialmente entre 6,5 – 7,5 utilizando agentes alcalinos, preferencialmente hidróxido de sódio ou agentes ácidos, preferencialmente ácido clorídrico.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a imobilização das proteases ocorrer por meio de imersão da matriz porosa em uma solução contendo um complexo enzimático de proteases do tipo endo- e exopeptidases, sendo preferencialmente uma protease de *Aspergillus oryzae*, Bromelina e Corolase H-PH, com

concentrações entre 0,01 – 0,2% m/v.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de após a adsorção das enzimas na matriz porosa, a matriz porosa contendo enzimas, é revestida por um biopolímero como quitosana, alginato ou carragenana, sendo preferencialmente quitosana, em concentração entre 0,5 – 3% m/v.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizado** pelo fato de a matriz porosa ser preferencialmente uma matriz celulósica, e incluir adicionalmente materiais poliméricos porosos inertes, como quitina ou borracha, materiais naturais como madeira, carvão ativado, rochas, cerâmicas.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de a matriz porosa ser recuperada por meio de uma peneira com aberturas de 8 a 18 mesh, e ser utilizada até um máximo de 25 ciclos consecutivos.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a digestão enzimática ser realizada aquecendo a suspensão de vinhaça de arroz a uma faixa de temperatura entre 35 – 65°C, preferencialmente entre 45 – 55°C, por 1 a 24 horas, sob agitação mecânica de 50 – 300 rpm, com a utilização das proteases previamente imobilizadas.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de a mistura proveniente da digestão enzimática ser processada através de meios de separação, como coador de pano, papel filtro, sistema de filtração à vácuo, tela metálica, centrifugação ou decantação, em que o hidrolisado de vinhaça é utilizado para a produção do fertilizante.

11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de o fertilizante compreender de 10 a

25% do peso seco do material de aminoácidos livres, oligopeptídeos e peptídeos, de 0 a 10% do peso seco do material de açúcares solúveis, até 5% do peso seco final de fosfatos em geral e íons potássio.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de opcionalmente o hidrolisado da vinhaça ser associado a um rizo-inoculante, preferencialmente uma rizobactéria, compreendendo os gêneros *Azospirillum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, preferencialmente do gênero *Azospirillum*, preferencialmente a espécie *Azospirillum brasilense*.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de a associação ocorrer opcionalmente através de um produto que contenha fitormônios oriundos de uma fermentação do hidrolisado com os referidos microrganismos.

14. Uso do fertilizante obtido pelo processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** pelo fato de ser como enraizador, auxiliar de germinação e fertilizante foliar.

## FIGURAS

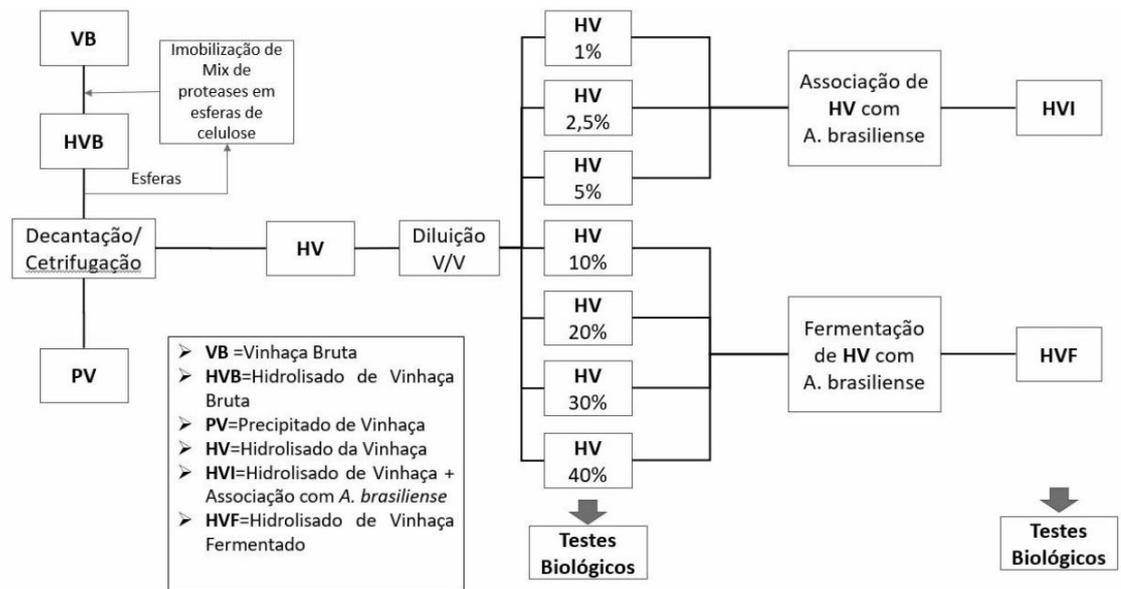


FIG. 1

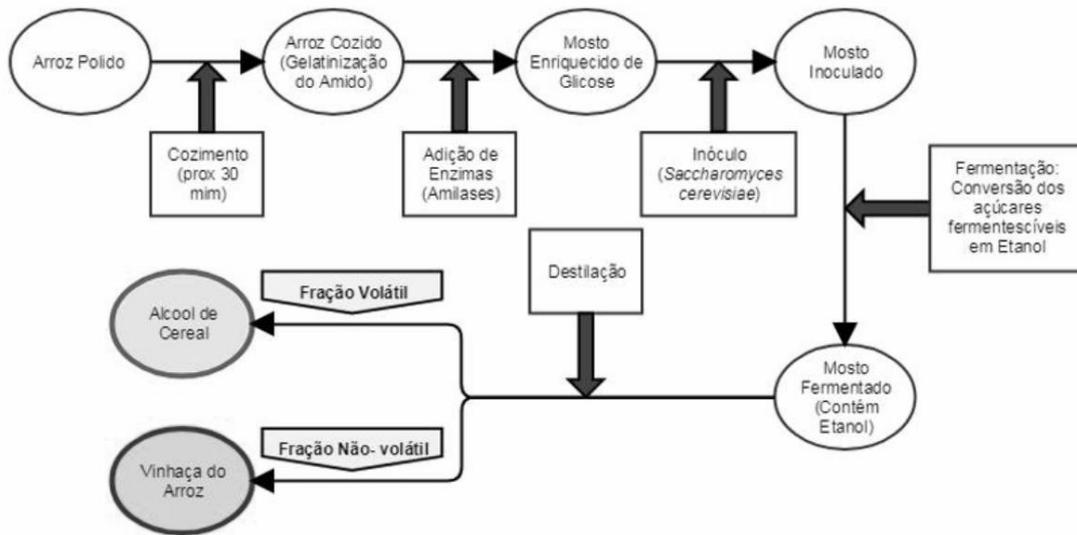


FIG. 2

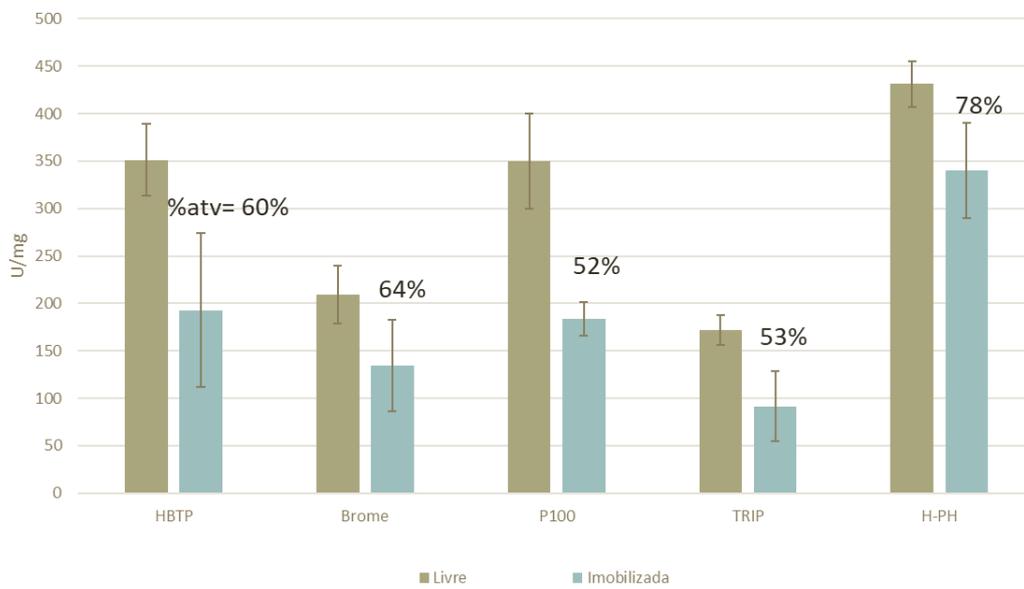


FIG. 3

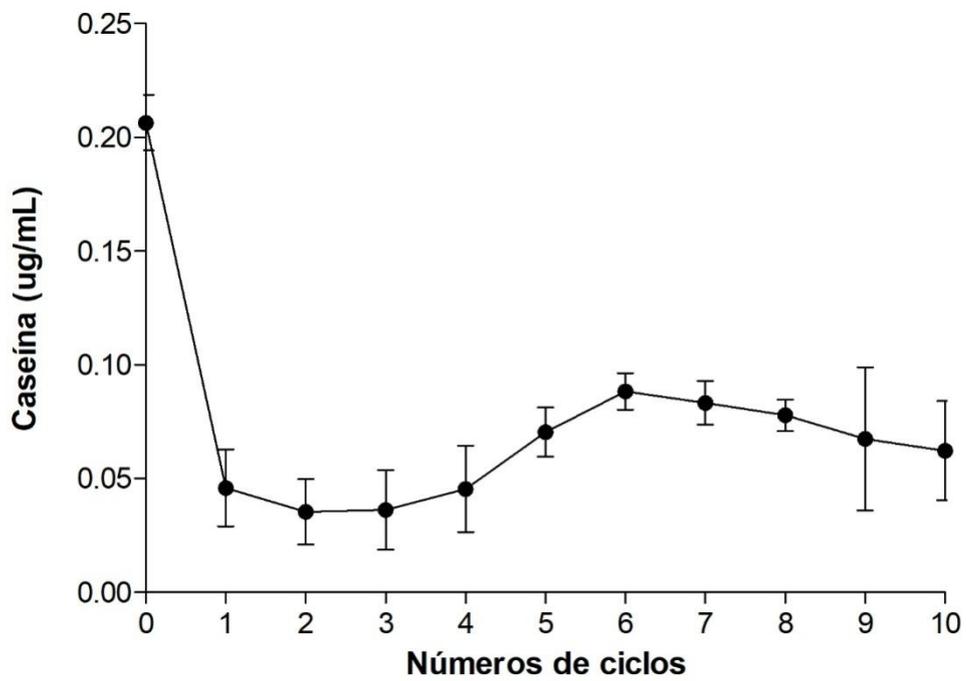


FIG. 4

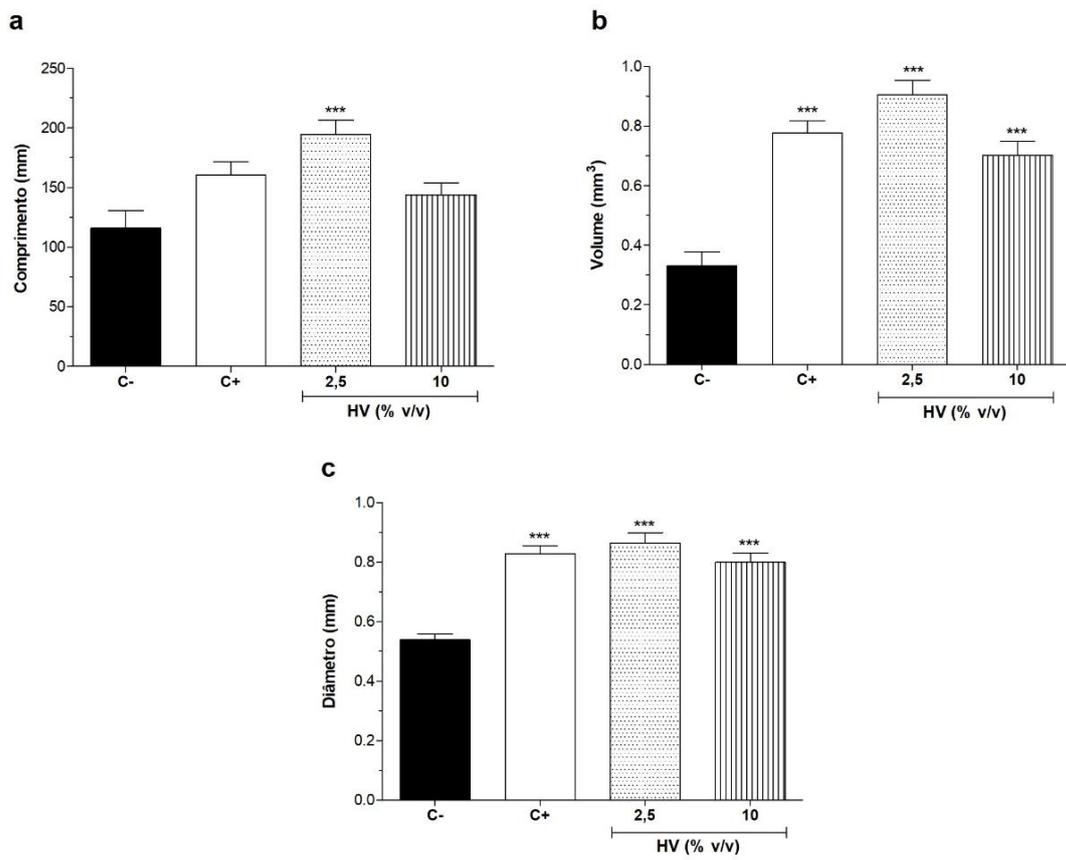


FIG. 5

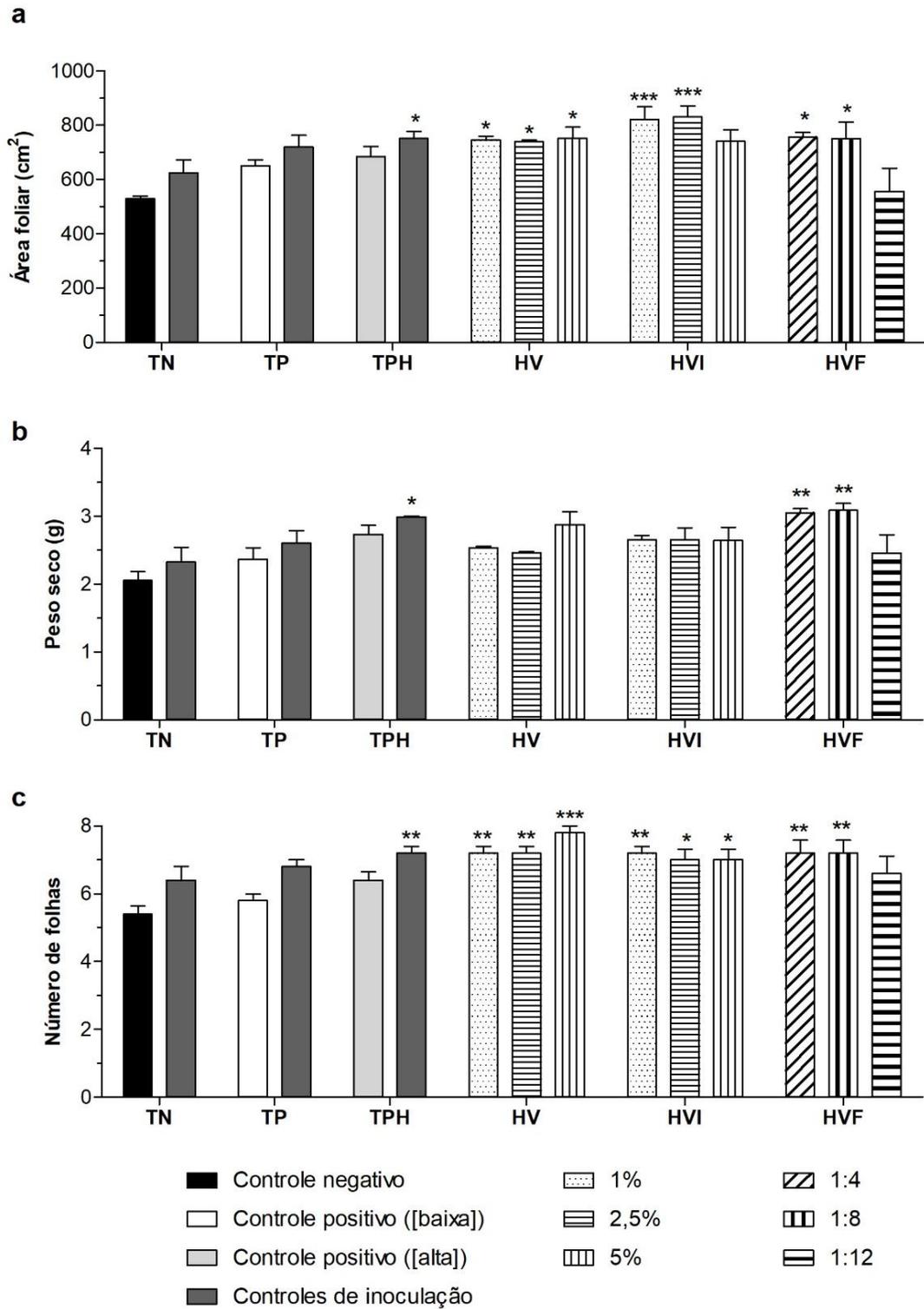
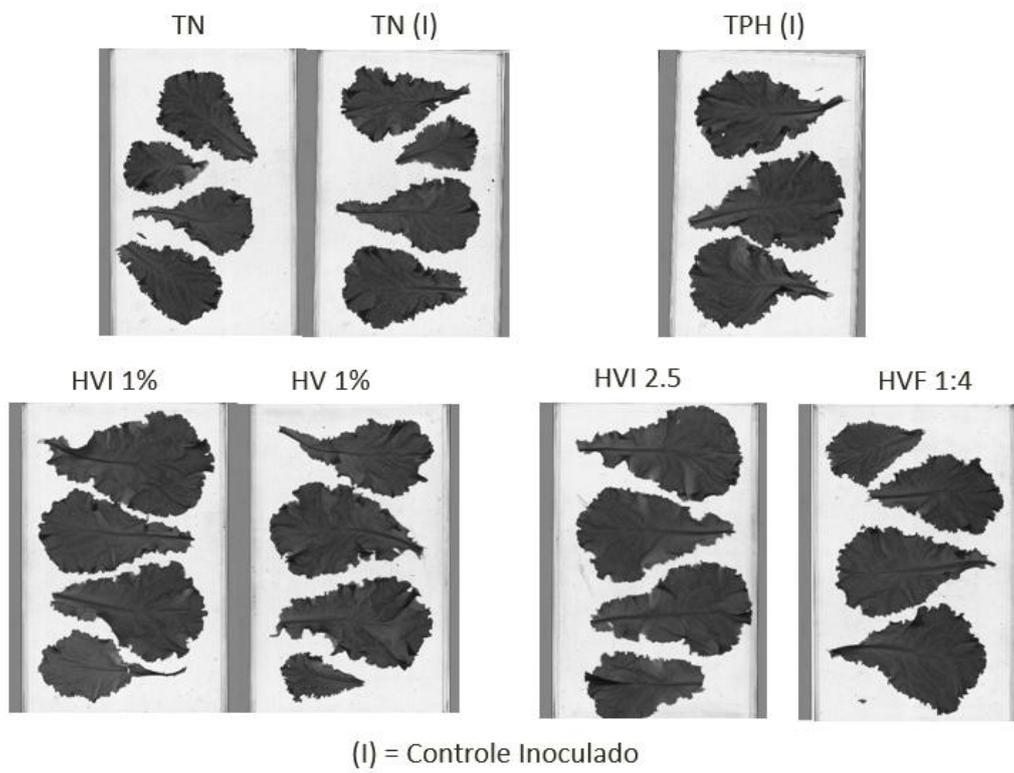


FIG. 6

**FIG. 7**

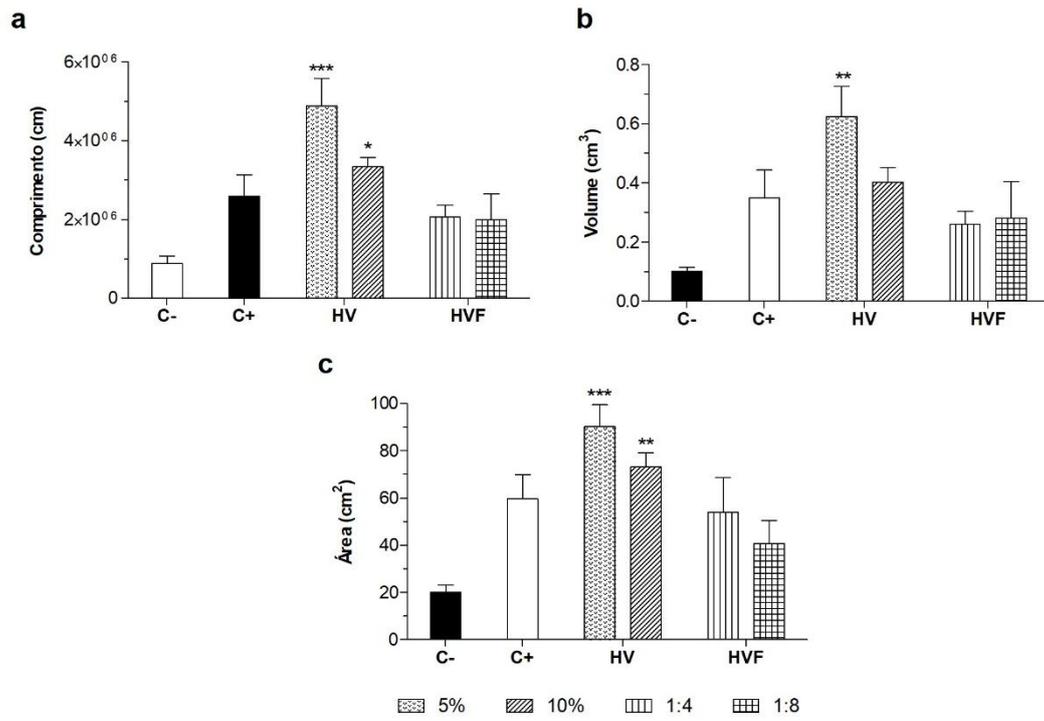


FIG. 8

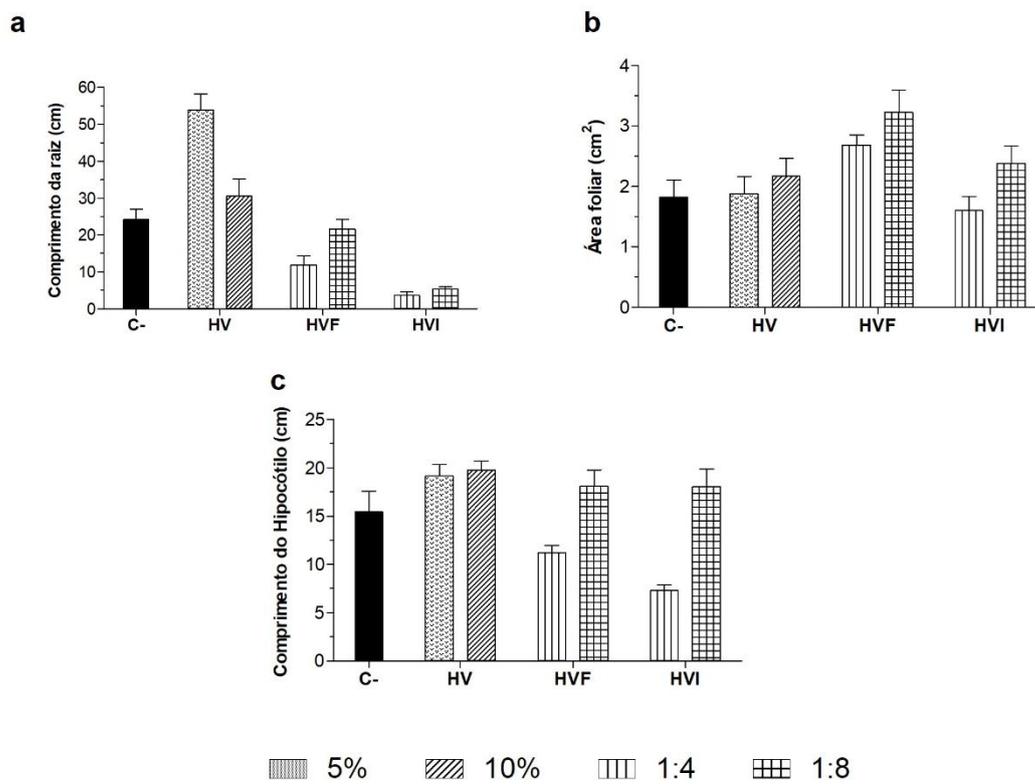


FIG. 9

**RESUMO****PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E USO DO FERTILIZANTE OBTIDO**

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de fertilizante orgânico composto a partir de vinhaça de arroz proveniente da produção de álcool de arroz. Para isso, o processo envolve a produção de um hidrolisado enzimático (HV) tendo como característica a presença de aminoácidos livres, valendo-se de imobilização enzimática (complexo enzimático de proteases) em matriz de celulose, para emprego ou comercialização total ou parcial, com finalidades de aplicação nas áreas de agronomia, engenharia florestal e biotecnologia. O hidrolisado enzimático pode também atuar como substrato em processos fermentativos, incorporando à composição do fertilizante, moléculas de interesse agronômico, gerando um fertilizante enriquecido com fitormônios (HVF). Adicionalmente, o hidrolisado enzimático pode ser associado sinergicamente à um rizo-inoculante, composto por microrganismo promotor de crescimento vegetal (HVI). Os produtos resultantes do processo descrito nesta tecnologia podem atuar como fertilizante foliar, enraizador ou auxiliar de germinação.