



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

(21) BR 102013028239-1 A2



(22) Data do Depósito: 01/11/2013

(43) Data da Publicação: 22/09/2015

(RPI 2333)

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

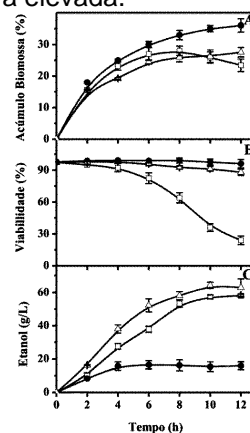
(51) Int. Cl.: C12P 7/06; C12N 1/16; C12R 1/72; C12R 1/85

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) Inventor(es): CECILIA LALUCE, JÉSSICA CAROLINA MEDINA GALLARDO, MARIA OLIVIA CAMPOS MASIERO, EDUARDO MAFFUD CILLI

(74) Procurador(es): FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) Resumo: RESUMO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL Esta invenção trata de um processo de produção de etanol que ocorre pela adaptação de um pool de leveduras e a fermentação ocorre a uma temperatura elevada.



PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo da produção de etanol.

5 ESTADO DA TÉCNICA

A produção de etanol nos processos industriais ocorre a uma temperatura entre 32 °C e 35 °C, porém temperaturas maiores são observadas durante períodos de elevação do calor no ambiente. Entretanto, as leveduras *Saccharomyces*
10 *cerevisiae* geralmente empregadas nesse processo têm uma temperatura ótima de crescimento na ordem de 30 °C a 34 °C, o que afeta a produtividade deste processo.

Além da temperatura, o etanol também tem vários efeitos sobre a levedura e sobre o processo de fermentação.
15 A concentração elevada de etanol, entre 8 e 12% v/v, produzido no final de cada ciclo de fermentação nos processos industriais é o fator de estresse que mais afeta a levedura durante o processo, sendo que a toxicidade do etanol aumenta com a elevação da temperatura.

20 Outro fator de estresse que afeta o crescimento de *S. cerevisiae* é o glicerol produzido principalmente como resultado da re-oxidação do excesso de NADH formado em condições anaeróbicas. Durante as fermentações industriais 5% a 8% dos açúcares disponíveis no meio são convertidos a
25 glicerol pelas células de levedura.

Desta forma, uma levedura capaz de produzir etanol e tolerar altos níveis de estresses no meio de crescimento, bem como a temperaturas acima daquelas toleradas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser útil à produção
30 de etanol durante os períodos da safra em que a temperatura

se eleva.

A levedura não-*Saccharomyces*, *Issatchenkia orientalis*, é termotolerante, sendo capaz de crescer a temperaturas maiores que 40 °C, além de suportar uma grande variação no
5 pH do meio.

Foi mostrado que esta levedura é capaz de utilizar tanto o glicerol como o ácido málico como fonte de carbono, entretanto, como não secreta a enzima invertase, responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e
10 frutose, *I. orientalis* é pouco eficiente na produção do etanol a partir do melaço de cana-de-açúcar.

Na literatura de patentes vemos o documento MX PA04000697 que trata do uso de *I. orientalis* na obtenção de xaropes ricos em glicose e frutose.

15 Um processo de cofermentação do mosto de uva com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis* com a obtenção de um vinho com reduzido teor de ácido málico é conhecido desde 2008. Neste processo, a fermentação ocorre a 20 °C durante 15 dias e a razão entre
20 o volume final de leveduras de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* empregado durante a fermentação variou entre 4:1, 1:1 e 1:4.

Portanto, como observado, o estado da técnica não prevê nenhum processo de fermentação do melaço de cana-de-
25 açúcar em elevadas temperaturas, pelo emprego associado das leveduras *Issatchenkia orientalis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

O objetivo da presente invenção é um processo de
30 produção de etanol pela fermentação em temperaturas

elevadas do mosto com um *pool* de leveduras.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Para se obter uma completa visualização do objetivo da presente invenção, é necessária a leitura deste documento e a análise dos desenhos que o acompanham e aos quais se faz referênci
5 a referênci
referência conforme segue abaixo.

Figura 1 - efeito da composição do inóculo sobre a fermentação.

Figura 2 - biomassa de leveduras durante a
10 fermentação.

Figura 3 - gráfico representando o efeito da temperatura sobre as leveduras.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção trata de um processo de produção de etanol que compreende as etapas de:
15 de etanol que compreende as etapas de:

- (a) preparar o mosto;
- (b) adicionar um *pool* de leveduras;
- (c) fermentar o mosto a uma temperatura elevada;
- (d) destilar o fermentado.

Na etapa (a) é preparado um mosto compreendido de um meio rico em açúcares, obtido pela clarificação do melaço de cana-de-açúcar, xarope de cana-de-açúcar, melaço de beterraba, ou xarope de milho. A clarificação se dá por meios conhecidos do estado da técnica.
20

Na modalidade preferida da invenção, a clarificação ocorre inicialmente pela correção dos açúcares totais do meio rico em açúcares. A correção se dá pela diluição entre 1 a 4 vezes do meio rico em açúcares; seguido da correção do pH até entre 4,5 a 5,0. A correção do pH é feita com um acidulante, tal como o H₂SO₄.
25
30

Opcionalmente o meio é aquecido entre 90 a 105 °C, durante entre 30 a 60 minutos, preferencialmente em uma autoclave. Em seguida, o meio é deixado resfriando até atingir a temperatura ambiente, e os sólidos são removidos
5 por decantação com coleta do sobrenadante. O líquido resultante é o mosto rico em açúcares.

Na etapa (b), é adicionado ao mosto entre 5 a 30 g/L de um *pool* de leveduras consistido de uma mistura 1:1 a 1:4 entre as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia*
10 *orientalis*. Preferencialmente, é adicionado ao mosto entre 8 a 25 g/L de um *pool* de leveduras consistido de uma mistura 1:3 entre *S. cerevisiae* e *I. orientalis*. Mais preferencialmente ainda, o *pool* de leveduras é consistido de uma mistura entre a linhagem híbrida e termotolerante
15 63M de *S. cerevisiae* e a linhagem 195B de *I. orientalis*.

A etapa (c) ocorre a uma temperatura elevada compreendida entre 34 a 42 °C durante 7 a 12 horas; pelo processo de batelada simples, ou batelada alimentada.

A utilização do *pool* de leveduras 1:3 de *S. cerevisiae*
20 e *I. orientalis* na fermentação apresentou efeitos positivos tanto na manutenção da viabilidade quanto na produção de etanol, pois a sacarose hidrolisada pela invertase secretada pela levedura *S. cerevisiae* deixa disponível no meio os açúcares glicose e frutose, os quais são
25 rapidamente assimilados e convertidos em etanol pela levedura *I. orientalis*, indicando, desta forma, um efeito sinérgico entre as duas leveduras durante a fermentação realizada entre 34 a 42 °C. A Figura 1 apresenta a comparação entre a fermentação do mosto nas condições
30 acima, quando utilizado as leveduras isoladas e o *pool* de

leveduras.

O pool de leveduras de *S. cerevisiae* e *I. orientalis* é utilizado na fermentação do mosto tanto no processo em batelada simples, como no processo de batelada alimentada.

5 A batelada simples é um processo de fácil operação e controle, minimizando os riscos de contaminação; porém, nesse processo o esgotamento dos nutrientes do mosto é rápido e ocorre com formação de concentrações elevadas de etanol, o que aumenta a toxidez do meio para as leveduras.
10 No processo de batelada alimentada, se observa um aumento significativo na produção de etanol, assim como a diminuição no tempo de fermentação, quando comparada com a fermentação em batelada simples.

O processo de produção de etanol em batelada
15 alimentada apresenta algumas vantagens em relação ao processo em batelada simples, dentre as quais podemos citar: a concentração dos açúcares no meio dificilmente excede 5 a 7% m/v; minimização da formação de produtos tóxicos ao metabolismo das leveduras.

20 Portanto, preferencialmente, no processo de produção de etanol desta invenção a fermentação do mosto ocorre a uma temperatura entre 40 a 42 °C entre 7 a 9 horas, pelo processo de batelada alimentada.

A Tabela 1 mostra os parâmetros fermentativos
25 referentes para ambos os processos. Um aumento na produtividade é observado com a utilização da batelada alimentada, e o tempo de fermentação diminuiu de 12 h para 8 h.

Parâmetros fermentativos	Batelada simples	Batelada alimentada
Tempo de fermentação (h)	12	8

Parâmetros fermentativos	Batelada simples	Batelada alimentada
Acúmulo biomassa (g/L)	2,65±0,31	5,38±1,70
Etanol produzido (g/L)	64,30±1,81	78,76±2,08
Produtividade (g/L/h)	5,36	9,85
Rendimento (%)	94,2	91,0
Açúcar residual (%)	2,31±0,53	1,06±1,5
Viabilidade (%)	88,0±3,0	90,8±3,5

Tabela 1. Parâmetros fermentativos durante a fermentação em batelada simples e batelada alimentada a temperatura elevada.

O estado da técnica descreve que a levedura *I. orientalis* é encontrada nas fases iniciais da produção de
 5 vinhos como sendo uma levedura sensível ao etanol. Entretanto, no processo de produção de etanol objeto desta invenção foi verificado que com o uso do *pool* de leveduras, mesmo na temperatura acima de 40 °C na qual o etanol é bastante tóxico é possível obter concentrações altas de
 10 etanol com uma boa viabilidade celular de ambas as espécies de levedura.

Além disto, várias linhagens de *I. orientalis* foram capazes de produzir etanol com um rendimento teórico 80 a 95% a temperaturas entre 40 °C a 42 °C em meios definidos.

15 A etapa (d) ocorre por meios conhecidos pelos versados na arte da destilação, e o rendimento final deste processo é elevado, na faixa de 80 a 95% conforme pode ser observado nos exemplos e Figuras abaixo.

20 Desta forma, a presente invenção apresenta uma fermentação vantajosa do mosto, visto que requer um menor gasto de tempo para a produção de etanol a temperatura entre 37 e 42 °C, considerada elevada pelo estado da técnica atual.

Os objetos desta invenção, acima descritos, têm suas

concretizações ilustradas pelos exemplos abaixo. Entretanto, cabe ressaltar que os exemplos apresentados são meramente ilustrativos e não devem ser empregados na limitação dos direitos dos inventores, que se restringem
5 somente àquilo contido nas reivindicações em anexo.

Finalmente, embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da
10 invenção.

Exemplos

Exemplo 1 - Tratamento da matéria-prima:

O melaço (60-65%, ART) foi clarificado antes de seu uso. O melaço estoque é diluído duas vezes e, em seguida, o
15 seu pH é ajustado a 4,5 com adição de H₂SO₄ antes de ser submetido ao aquecimento pelo vapor da autoclave durante 40 min. Em seguida deixa-se decantar os sólidos suspensos por uma noite e coleta-se o sobrenadante. O melaço clarificado é estocado a 4 °C.

Exemplo 2 - Propagação do inóculo:

O inóculo das duas leveduras foi propagado, separadamente, em quatro etapas contendo concentrações crescentes de açúcar (3%, 5%, 8%, 12% de açúcar redutor total-ART) com a finalidade de conseguir uma melhor
25 adaptação das células às altas concentrações de açúcar e etanol. A propagação foi realizada a 37 °C durante 48 h (12 h cada etapa) e agitação de 100 rpm. Após a propagação, as células são coletadas por centrifugação, lavadas com água destilada e finalmente suspensas em água para formar o
30 leite de levedura.

Exemplo 3 - Fermentação em batelada simples:

Os frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de melaço 15,0±1,0% (ART) são inoculados com 10 g/L da cultura pura de *S. cerevisiae* e *I. orientalis*. Na fermentação mista é
5 utilizada uma proporção de 1:3 das leveduras *S. cerevisiae* e *I. orientalis*, respectivamente. Os frascos são incubados a 42 °C e 80 rpm durante 12 h e vedados por meio de uma rolha de borracha perfurada contendo dois tubos de vidro inseridos para permitir a amostragem, a saída do CO₂
10 durante as fermentações e minimizar a evaporação do etanol.

Exemplo 4 - Fermentação em batelada alimentada:

Foi utilizado um sistema semiautomático de dois fermentadores equipados com dispositivos independentes para o ajuste do pH, temperatura, agitação e amostragem. Os
15 fermentadores com capacidade de 350 mL são inoculados com 24,0±1,0 g/L do *pool* de leveduras *S. cerevisiae* e *I. orientalis* (proporção 1:3, m/v) e alimentados com melaço durante 4 h (vazão de alimentação de 0,44 mL/min), sendo a concentração final de açúcares no meio 18,0±1,0% ART e o
20 volume final de fermentação 150 mL.

Para o acompanhamento da permanência das células durante a fermentação, amostras são retiradas do fermentador e plaqueadas em meio sólido YPD. Após 48 h de incubação a 30 °C, a permanência das células pode ser
25 determinada por contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), uma vez que as colônias das leveduras *S. cerevisiae* e *I. orientalis* apresentam diferente morfologia.

Exemplo 5 - Determinação dos parâmetros fisiológicos:

30 A biomassa celular é determinada por medidas de

densidades óticas a 570 nm (via espectrofotometria) que são convertidas a valores de massa seca por meio de curva padrão, a qual correlaciona absorvância em massa seca expressa em g/L. A viabilidade celular é determinada pelo método do azul de metileno; o açúcar residual é determinado usando-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico expresso em g/L ART (açúcar redutor total), a hidrólise dos açúcares é feita com HCl 6 mol/L durante 7 min em banho-maria a 60 °C. O etanol é determinado por cromatografia gasosa.

10 Exemplo 6 - Determinação dos parâmetros cinéticos de fermentação:

Os fatores de conversão do substrato em produto (Y_p/s), do substrato em biomassa (Y_x/s), a produtividade volumétrica e o rendimento do processo são calculados como descrito por Laopaiboon *et al.*

15 Exemplo 7 - Fermentação com o uso de diferentes inóculos:

A Figura 1 ilustra a etapa (c) realizada de acordo com a modalidade preferida da invenção, no qual a reação ocorre durante 8 horas, a uma temperatura de 42 °C. Na figura 1 as legendas significam (-□-) fermentação do inóculo contendo somente *S. cerevisiae*; (-●-) fermentação do inóculo contendo somente *I. orientalis* e (-△-) fermentação com o *pool* de leveduras.

25 Por essa figura pode ser visto que a levedura *I. orientalis* sozinha apresenta maior acúmulo de biomassa e manutenção da viabilidade, mas tem uma baixa produção de etanol em relação ao *S. cerevisiae*. Isto devido ao fato da levedura *I. orientalis* não conseguir fermentar todos os
30 açúcares disponíveis no melaço, uma vez que esta levedura

não secreta a enzima invertase, responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose. Por outro lado, a levedura *S. cerevisiae* apresentou menor acúmulo de biomassa, baixa viabilidade e produção elevada de etanol em 5 comparação com a *I. orientalis*. Já a utilização do *pool* de leveduras na fermentação apresentou efeitos positivos tanto na manutenção da viabilidade quanto na produção de etanol.

Exemplo 8 - Cálculo da biomassa:

Um aspecto importante para o processo de produção de 10 etanol é o acúmulo de biomassa, já que, desta maneira, a renovação celular é garantida ao longo do processo. Assim, acompanhar as variações na proporção de leveduras dominantes em uma fermentação industrial é fundamental. Por isto, acompanhou-se a permanência das duas leveduras no 15 decorrer da fermentação em ambos os processos. A contagem das colônias foi feita após 48 h de incubação em meio YPD a 30 °C. A diferenciação dos dois tipos de colônias ocorre em placas de YPD: colônias lisas e menores pertencentes à levedura *S. cerevisiae* e colônias rugosas e maiores 20 pertencentes à levedura *I. orientalis*. Deste modo a tecnologia conta com uma técnica fácil e simples para a determinação da permanência de ambas as leveduras no decorrer do processo de fermentação.

A Figura 2 ilustra uma queda no número de UFC/mL tanto 25 para *S. cerevisiae* quanto para *I. orientalis* após 6 h de fermentação em batelada simples (Figura 2A). Já na Figura 2B, observa-se um aumento no número de células de *I. orientalis* durante o tempo de alimentação do reator (4 h). Após a alimentação o número de UFC/mL desta levedura é 30 quase equivalente ao número inicial de células inoculadas.

Esta perda no número de células após 4 h de fermentação é também observada para a levedura *S. cerevisiae*. A possível razão para este resultado é o esgotamento dos açúcares disponíveis no meio e a alta temperatura de fermentação.

5 Apesar disto, o uso do *pool* de leveduras melhorou a produtividade e rendimento de etanol durante o processo de fermentação a 42 °C.

Exemplo 9 - Efeito da temperatura:

As fermentações industriais que utilizam a levedura *S.*
10 *cerevisiae* geralmente ocorrem entre 32 e 35 °C. Por isto, realizaram-se fermentações em batelada alimentadas a 34 °C e 42 °C. A Figura 3 ilustra que a diminuição da temperatura de 42 °C para 34 °C favoreceu a formação de biomassa até o final da alimentação do fermentador (4 h). Observou-se uma
15 queda na viabilidade das células do *pool* de leveduras a partir de 9 h de fermentação a 42 °C. No entanto, isto não foi observado a 34 °C, pois a viabilidade celular foi mantida ao redor de 95% após 10 h de fermentação. Por outro lado, a produção de etanol foi equivalente tanto a 34 °C
20 quanto a 42 °C. Os resultados apresentados demonstraram inovação tecnológica para o setor sucroalcooleiro, uma vez que a utilização do *pool* de leveduras aumentou a produção de etanol em temperatura elevada. Legenda da Figura 3 - *S. cerevisiae* e *I. orientalis* (proporção 1:3, expresso em
25 massa seca): 34 °C (-□-) e 42 °C (-●-).

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de produção de etanol **caracterizado por** compreender as etapas de:

- (a) preparar o mosto;
- 5 (b) adicionar um *pool* de leveduras;
- (c) fermentar o mosto a uma temperatura elevada;
- (d) destilar o fermentado.

2 - Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** na etapa (a) ser preparado um mosto
10 compreendido de um meio rico em açúcares, obtido pela clarificação do melaço de cana-de-açúcar, xarope de cana-de-açúcar, melaço de beterraba, ou xarope de milho.

3 - Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** clarificação ocorrer inicialmente pela
15 correção dos açúcares totais do meio rico em açúcares pela diluição entre 1 a 4 vezes do meio rico em açúcares; seguido da correção do pH até entre 4,5 a 5,0 com um acidulante.

4 - Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** opcionalmente o meio ser aquecido entre
20 90 a 105 °C, durante entre 30 a 60 minutos; seguido pelo resfriando até atingir a temperatura ambiente, e remoção dos sólidos por decantação com coleta do sobrenadante.

5 - Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de na etapa (b) ser adicionado ao
25 mosto entre 5 a 30 g/L de um *pool* de leveduras consistido de uma mistura 1:1 a 1:4 entre as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis*.

6 - Processo, de acordo com a reivindicação 5,

caracterizado por adicionar ao mosto entre 8 a 25 g/L de um pool de leveduras consistido de uma mistura 1:3 entre *S. cerevisiae* e *I. orientalis*.

7 - Processo, de acordo com a reivindicação 1,
5 **caracterizado pela** etapa (c) ocorrer a uma temperatura elevada compreendida entre 34 a 42 °C durante 11 a 12 horas; pelo processo de batelada simples.

8 - Processo, de acordo com a reivindicação 1,
10 **caracterizado pela** etapa (c) ocorrer a uma temperatura elevada compreendida entre 34 a 42 °C durante 7 a 9 horas; pelo processo de batelada alimentada.

9 - Processo, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por se obter rendimento final na faixa de 90 a 95%.

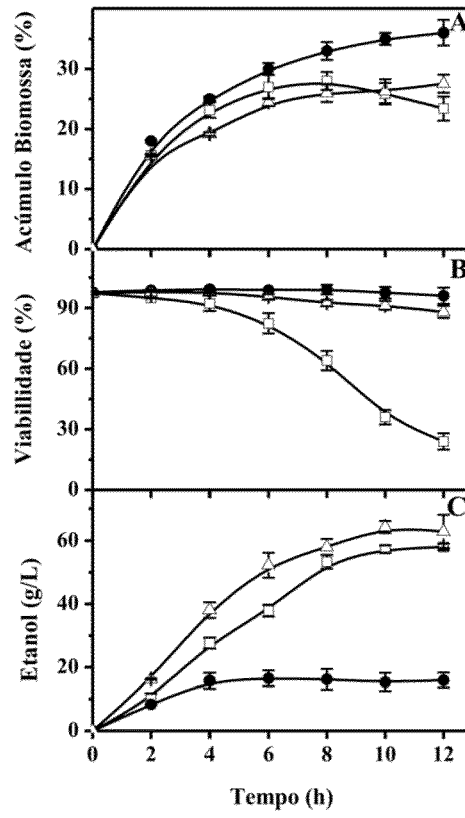


Figura 1

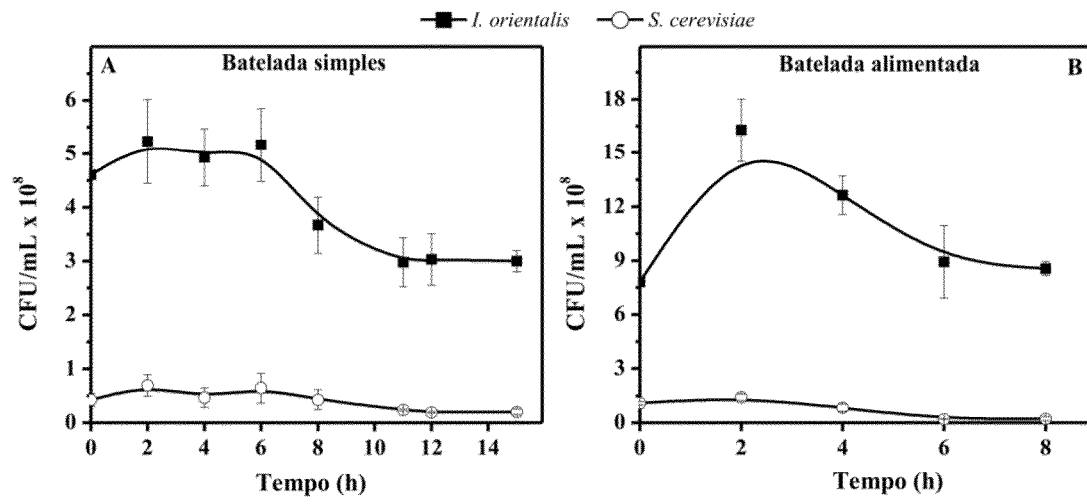


Figura 2

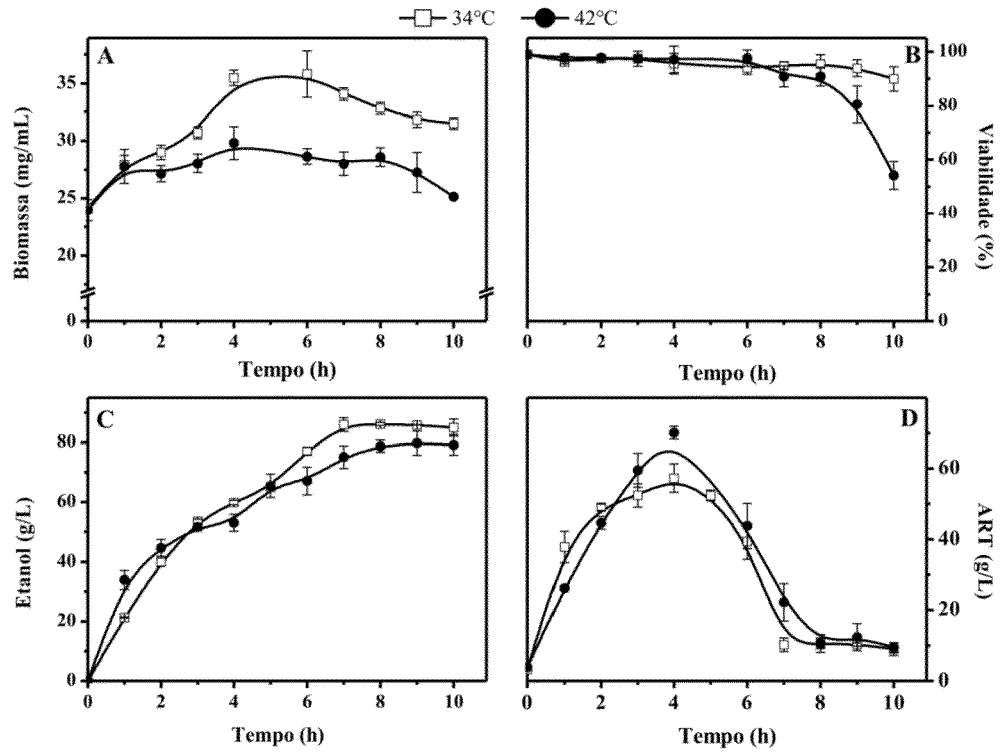


Figura 3

RESUMO

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

Esta invenção trata de um processo de produção de etanol que ocorre pela adição de um *pool* de leveduras e a
5 fermentação ocorre a uma temperatura elevada.