



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

(11) PI 0703327-3 B1

(22) Data do Depósito: 25/07/2007

(45) Data de Concessão: 13/12/2016



(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE IMOBILIZADA EM CRISOTILA EM BIORREATOR PNEUMÁTICO DE CIRCULAÇÃO INTERNA

(51) Int.Cl.: C12P 7/14; C12P 7/08; C12R 1/865

(73) Titular(es): SAMA S.A. - MINERAÇÕES ASSOCIADAS. FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR

(72) Inventor(es): CÉLIA MARIA ARAÚJO GALVÃO; PAULO IGNÁCIO FONSECA DE ALMEIDA; ALBERTO COLLI BADINO JUNIOR; RUBENS RELÁ FILHO

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IMOBILIZADA EM CRISOTILA EM BIORREATOR PNEUMÁTICO DE CIRCULAÇÃO INTERNA".

5 Campo da Invenção

A presente invenção pertence ao campo dos processos de produção de etanol por fermentação em presença de microorganismos, mais especificamente, a um processo de produção de etanol por fermentação em presença de
10 *Saccharomyces cerevisiae* immobilizada em crisotila em biorreator pneumático de circulação interna.

Fundamentos da Invenção

A indústria do álcool desenvolveu-se na Europa em meados do século XIX e apenas no último quarto do século
15 passado é que a produção de etanol teve início no Brasil. Em 1931, a primeira destilaria de álcool anidro foi instalada e o Governo Federal estabeleceu a obrigatoriedade da adição de 5% de etanol à gasolina. Em 1974, quando foi deflagrada a grande crise internacional do petróleo, a
20 produção brasileira de etanol iniciou um novo ciclo buscando alternativas para o problema do combustível líquido. Com o lançamento do Proálcool em 1975, a produção nacional de álcool expandiu-se significativamente, uma vez que o volume produzido deveria, agora, atender a uma frota

de aproximadamente quatro milhões de automóveis, que se moviam com álcool puro, e também cumprir com a obrigatoriedade da mistura desse combustível a toda gasolina usada no país conforme Amorim et al., "Produção de Etanol", Biotecnologia Industrial Processos Fermentativos e Enzimáticos, São Paulo, vol. 3, pp. 1-43, 2001.

Atualmente, a demanda por esse "combustível verde", obtido a partir de matéria-prima renovável, tem aumentado sobremaneira por diversos fatores, a saber:

10 - Aumento do teor de álcool anidro na mistura álcool-gasolina, hoje definido em 23%;

- A realidade crescente do carro "flex-fuel" ou bicombustível, que em agosto de 2006 atingiu a marca dos dois milhões de carros produzidos e comercializados, embora a previsão seja que a partir de 2007, 100% dos carros vendidos no Brasil sejam "flex-fuel" (Mendonça de Barros e colaboradores, 2005;

<http://www.ambientebrasil.com.br/noticias/index.php3?action=ler&id=27368>, em Outubro/2006);

20 - Início da produção comercial de biodiesel, que incorpora em seu principal processo de obtenção (transesterificação) uma reação química dos óleos vegetais ou gorduras animais com o etanol, majoritariamente (<http://www.biodiesel.gov.br/>); e

- Surgimento de novos grandes mercados consumidores como Japão e China.

Estima-se que na safra 2006/2007 sejam superados os 17 bilhões de litros de etanol inicialmente previstos em função das novas plantações, antecipação da safra e instalação de novas usinas de processamento de cana (http://www.cnpqm.embrapa.br/conjuntura/0603_Sucroalcooleiro.pdf, em Março/2006).

A produção de etanol dá-se, de maneira geral, por duas vias principais: a sintética e a fermentativa. A via sintética é caracterizada pela obtenção do etanol a partir de hidrocarbonetos não-saturados (eteno e etino), gases de petróleo e da hulha, mas com importância restrita a países com grandes reservas de petróleo e indústria petroquímica avançada. A via fermentativa é a forma empregada no Brasil para a obtenção de etanol, em consequência da grande quantidade de matéria-prima, comumente a cana-de-açúcar, existente em todo o país e sua distribuição geográfica que permite seu cultivo em quase todo o território e durante todo o ano, conforme a já citada referência de Amorim et al., "Produção de Etanol", Biotecnologia Industrial Processos Fermentativos e Enzimáticos, São Paulo, vol. 3, pp. 1-43, 2001.

Vários processos para produção de etanol por via

fermentativa são descritos na literatura, mas o mais popular deles ainda é o processo em batelada com reutilização das células (Melle-Boinot). Atualmente, uma parcela significativa das indústrias produtoras de etanol vem substituindo o processo em batelada por cultivos contínuos multi-estágios com centrifugação, tratamento e reciclo de células para o primeiro estágio, processo que apresenta vantagens como alta conversão de substrato e produtividade em etanol. Vide a este respeito o artigo de Wheals, A. et al., Trends in Biotechnology, London, vol. 17, pp. 482-487, 1999.

Uma etapa comum a ambos os referidos processos e que requer grande atenção é a separação das células ao final do processo. Esta operação é normalmente realizada por centrifugação. Por ser uma operação bastante onerosa, representando cerca de 25% do custo total de uma destilaria, deve, se possível, ser evitada, conforme Stroppa, C. T. et al, "Consumo de Açúcar por Bactérias Contaminantes da Fermentação Alcoólica Associados ao Uso de Antibióticos", STAB - Açúcar Álcool e Subprodutos, Piracicaba, vol. 16 (3), pp. 22-25, 1998.

Uma das formas mais comumente citadas na literatura visando solucionar o problema da separação das células consiste na utilização de células imobilizadas em

diferentes suportes, como por exemplo: vidro poroso e sílica tratada com glutaraldeído, vide o artigo de Navarro, J. M. e Durand, G., "Modification of Yeast Metabolism by Immobilization into Porous Glass", *European J. Appl. Microbiol.*, vol. 4, pp. 243-254, 1977; cerâmica Rasching coberta com gelatina e pulverizada com solução de glutaraldeído conforme citado por Marcipar, A. C. N. e Lebeult, B. L., "Immobilization of Yeasts on Ceramic Supports", *Biotechnology Letters*, vol. 1, pp. 65-70, 1980; celulose, vide o artigo de Szajáni, B. et al, "Continuous Production of Ethanol Using Yeast Cells Immobilized in Preformed Cellulose Beads", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 46, pp. 122-125, 1996; ágar e carvão ativado, vide Chaudhary, A. B. e Chinkholkar, S. B., "Cell Immobilization: A Critical Approach to Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*", *Indian Journal of Microbiology*, vol. 36, pp. 75-83, 1996; alginato de cálcio e carragena k, vide o artigo de Ryu, S. e Lee, K., "Comparison of Immobilization Matrix for Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Microbiology Biotechnology*, vol. 6, pp. 438-440, 1997.

No entanto, devido ao elevado custo de suportes tradicionais como os anteriormente citados, tem-se proposto

o emprego de suportes alternativos como a bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), os colmos de cana-de-açúcar, o bagaço da cana-de-açúcar, a madeira e a crisotila, dentre outros, para a imobilização de células. Assim, vide a patente

5 brasileira PI 9300474-5, intitulada "Processo de Produção de Etanol com Microrganismos Imobilizados em Colmos de Cana-de-Açúcar, Sistema para Produção de Etanol, e Processo para Imobilização de Microrganismos em Colmos de Cana-de-

10 Açúcar"; e os artigos de Debabrata D. A. S. et al., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 75, pp. 132-137, 1993; Chaudhary, A. B. e Chinkholkar, S. B., "Cell Immobilization: A Critical Approach to Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*", *Indian Journal of Microbiology*, vol. 36, pp. 75-83, 1996; a

15 tese de Fregonesi, A. A., "Adesão de Células de *Saccharomyces sp.* em Materiais Inorgânicos para a Produção de Etanol", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1998; Ogbonna, J. C. et al., *Bioresource Technology*, vol. 76, pp. 1-8, 2001 e Ogbonna, J. C., Liu,

20 Y., "Loofa (*Luffa cylindrica*) as a Carrier for Microbial Cell Immobilization", *J. Ferm. Bioeng.*, vol. 78 (6), pp. 472-473, 1994 e a tese de Rigo, M., "Estudo de Fermentação Alcoólica por Células de *Saccharomyces cerevisiae* Imobilizadas em Crisotila", Dissertação de Mestrado,

Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2001.

Há que se ressaltar, contudo, que embora numerosos suportes possam ser utilizados para imobilização de células, muitos apresentam sérios problemas para a
5 implementação em escala industrial, conforme o artigo de Monte Alegre, R. et al, "Ethanol Fermentation of a Diluted Molasses Medium by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Chrysotile", Braz. Arch. Biol. Technol., vol. 46 (4), 2003.

A crisotila é um silicato de magnésio de hábito
10 fibroso e fórmula química $3\text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, cuja formação está relacionada às modificações metamórficas ocorridas em rochas ultrabásicas de origem vulcânica. Sua estrutura é única e altamente organizada, constituída por 16 a 18 bicamadas de brucita-silicato enroladas coaxialmente que,
15 de acordo com a configuração que assumem, podem originar fibras longas ou curtas, sendo estas últimas mais comumente chamadas de fibrilas. A crisotila tem sido usada há muito tempo na indústria do fibrocimento em grande escala. Mais recentemente, tem sido empregada como suporte para células
20 (vide os pedidos de patente brasileiros PI 8930849-5 e PI 9700635-1) em processos de fermentação alcoólica, biorreduções e hidrólise da sacarose (Fregonesi, A. A., "Adesão de Células de *Saccharomyces* sp. em Materiais Inorgânicos para a Produção de Etanol", Dissertação de

Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1998;
 Wendhausen, R. et al., "Continuous Fermentation of Sugar
 Cane Syrup Using Immobilized Yeast Cells", Journal of
 Bioscience and Bioengineering, vol. 91, pp. 48-52, 2001;
 5 Rigo, M., "Estudo de Fermentação Alcoólica por Células de
Saccharomyces cerevisiae Imobilizadas em Crisotila",
 Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp,
 Campinas, 2001).

Segundo dados da literatura, as leveduras aderem-se
 10 preferencialmente às fibrilas da crisotila, originando um
 complexo células-suporte que não exhibe qualquer tipo de
 impedimento ao crescimento e/ou ao metabolismo celular,
 conforme Cassiola, F. et al., "Interaction between
Saccharomyces cerevisiae and Chrysotile", European Cells
 15 and Materials, vol. 2, pp. 30-35, 2001.

Entre as vantagens de uso da crisotila como suporte
 para a produção de etanol pode-se citar:

- Elevada capacidade de imobilizar células de levedura por absorção;
- 20 - Elevada estabilidade, o que permite seu uso por períodos prolongados de tempo e reuso;
- Elevada resistência a tratamentos térmicos;
- Baixo custo; e
- Estimulação da produção de etanol pela levedura,

aumentando assim a produtividade específica dos processos.

As vantagens apontadas estão possivelmente associadas ao aumento da estabilidade fisiológica e do metabolismo celular quando da interação positiva entre as leveduras e o
5 suporte sólido, como sugerido por Joekes, I. et al.,
"Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized onto Chrysotile for Ethanol Production", J. Chem. Technol. Biotechnol., vol. 73, pp. 54-58, 1998 e Monte Alegre, R.,
"Ethanol Fermentation of a Diluted Molasses Medium by
10 *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Chrysotile", Braz. Arch. Biol. Technol., vol. 46 (4), 2003.

Esta interessante descoberta gerou o depósito do pedido brasileiro PI 9700635-1 e, a partir deste, estudos relacionados com a técnica de imobilização, interação entre
15 *S. cerevisiae* e crisotila e produção de etanol em cultivos descontínuos e contínuos submersos têm sido publicados com resultados promissores em termos de conversão de substrato, produção e produtividade em etanol, vide Joekes, I. et al.,
"Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized
20 onto Chrysotile for Ethanol Production", J. Chem. Technol. Biotechnol., vol. 73, pp. 54-58, 1998; Fregonesi, A. A.,
"Adesão de Células de *Saccharomyces* sp. em Materiais Inorgânicos para a Produção de Etanol", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1998;

Rigo, M., "Estudo de Fermentação Alcoólica por Células de *Saccharomyces cerevisiae* Imobilizadas em Crisotila", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2001; Filloy, P. H. et al., "Activation of
5 Brazilian Chrysotile Surface Using Gas Flow in Batch Reactors", Paper presented at Congress Proceedings of the International Conference on Advanced Materials Processing Technology (AMPT 01), vol. 3, Universidad Carlos III de Madrid, Leganis/Spain, 2001; Wendhausen, R., "Continuous
10 Fermentation of Sugar Cane Syrup Using Immobilized Yeast Cells", Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 91, pp. 48-52, 2001 e Monte Alegre, R., "Ethanol Fermentation of a Diluted Molasses Medium by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Chrysotile", Braz. Arch. Biol. Technol.,
15 vol. 46 (4), 2003.

No entanto, não foram encontradas citações sobre a produção de etanol por *S. cerevisiae* imobilizada em crisotila *in natura* em biorreator *airlift*, objeto da presente invenção.

20 A literatura de patentes aponta vários documentos relacionados ao campo da invenção.

O pedido de patente brasileiro PI 0204931-7, intitulado "Processo de obtenção de microrganismos *Aspergillus terreus*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas*

oleovorans e *Serratia rubidaea* immobilizados em crisotila para aplicação em processos biocatalíticos e biotecnológicos”, refere-se ao processo de imobilização de microrganismos e organismos em fibras de amianto crisotila, 5 cuja finalidade é obter o microrganismo ou organismo imobilizado para reações orgânicas biocatalisadas. Fungos (*Aspergillus terreus* e *Rhizopus oryzae*) e bactérias (*Pseudomonas oleovorans* e *Serratia rubidaea*) são immobilizados em amianto crisotila para emprego como 10 biocatalisadores visando a transformação, através de reações enzimáticas, de compostos xenobióticos (substratos estruturalmente distintos dos substratos naturais das células), intencionalmente inseridos no ambiente do microrganismo e/ou organismo, em produtos nos quais existe 15 grande interesse comercial. Os microrganismos immobilizados em crisotila podem ser utilizados em processos contínuos, semi-contínuos e em batelada, reutilizados seqüencialmente, como também podem ser estocados por longos períodos, sem alteração das capacidades biotransformadoras dos mesmos. 20 Note-se que embora o objeto do pedido citado seja o uso de crisotila como suporte para imobilização, não há no mesmo a descrição nem a sugestão de imobilizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* visando a produção de etanol e, portanto, não representa anterioridade ao presente pedido.

A publicação CN 1403579, "Alcohol preparing airlift fermentation and separation coupling technological process and special equipment", trata de um processo para produção e separação do álcool a partir de um sistema constituído por um biorreator *airlift*, onde ocorre o processo fermentativo propriamente dito, acoplado à unidade de separação do produto, que é composta por um condensador e duas torres de adsorção/dessorção conectadas em paralelo. Esse sistema, referido como equipamento especial, opera sob um vácuo de 4000 a 8000 Pa com auxílio de uma bomba; as duas torres são usadas para adsorver e dessorver a mistura gasosa que é bombeada e o condensador é usado para coletar o álcool dessorvido. Como pode ser observado, embora o sistema apresentado também faça uso de um biorreator *airlift*, o sistema global não apresenta qualquer similaridade com o objeto da presente invenção, que não opera sob vácuo, não utiliza material adsorvente para recuperação do etanol e, ainda, utiliza células suportadas em crisotila.

A publicação MXPA05006992, "Proceso para la producción de etanol utilizando cristales estables de levadura en un reactor en lotes convencional modificado", apresenta a utilização de cristais estabilizados de levedura como alternativa à necessidade de adição de cultura fresca de

microrganismos em cada um dos reatores operando em batelada para a produção de etanol. Convencionalmente, os cristais de levedura que crescem após o início do processo fermentativo tendem a flotar sobre a superfície do caldo durante a fermentação, reduzindo o contato dos microrganismos com o meio de cultivo e, assim, aumentando significativamente o tempo de cultivo e reduzindo a velocidade de fermentação. Nesse contexto, a inovação na qual se baseia o processo descrito refere-se ao uso dos cristais estáveis de levedura em um reator em batelada modificado exclusivamente para este fim, o que resulta na redução do tempo de fermentação e aumenta a velocidade de produção de etanol. Pelo anteriormente descrito, pode-se concluir que o processo apresentado não tem qualquer similaridade com o objeto da presente invenção.

O pedido de patente brasileiro PI 0306523-5, intitulado "Processo de produção de etanol com microrganismos imobilizados em sabugos de milho e processo para imobilização de microrganismos em sabugos de milho", refere-se à utilização do sabugo de milho como um suporte alternativo para imobilização de microrganismos produtores de álcool e apresentação de um sistema onde não se observa a etapa de centrifugação. O sistema, que opera no modo contínuo, é constituído por três fermentadores fechados, em

série, e uma coluna específica para lavagem dos gases produzidos com água. No corpo dos fermentadores estão situadas telas que mantêm o leito semi-fluidizado, impedindo que os sabugos de milho contendo os

5 microrganismos imobilizados circulem livremente pelo reator e, ocasionalmente, obstruam as entradas/saídas do reator. O processo descrito difere grandemente do objeto da presente invenção, onde as fibras de crisotila contendo os microrganismos aderidos descrevem um movimento ascendente

10 pelo interior do tubo interno e ao atingirem o topo deste, retornam à base em fluxo descendente. Como é possível observar, embora ambos os sistemas se destinem à produção de etanol com células imobilizadas em suportes alternativos, o pedido citado não se constitui em

15 anterioridade para a presente invenção.

A patente brasileira PI 9300474-5, intitulada "Processo de produção de etanol com microrganismos imobilizados em colmos de cana-de-açúcar, sistema para produção de etanol e processo para imobilização de

20 microrganismos em colmos de cana-de-açúcar", refere-se à produção contínua de etanol por microrganismos imobilizados em colmos de cana-de-açúcar. O sistema é constituído por dois reatores em série. O mosto é alimentado continuamente pela lateral inferior do primeiro fermentador, tem fluxo

ascendente, sai pela parte superior, alimenta o segundo reator também pela parte superior e é retirado, completamente fermentado, pela parte inferior do mesmo. Neste sistema, o suporte contendo o microrganismo aderido é
5 retido no reator através de uma estrutura de sustentação que impede a livre circulação do complexo células-suporte pelo corpo do reator. O sistema aqui descrito tem estreita semelhança com o anteriormente mencionado (PI 0306523-5) embora não apresente similaridade com a presente invenção.

10 O pedido de patente brasileiro PI 9700635-1, intitulado "Processo de produção de etanol em alto rendimento em regimes contínuo e batelada", provê um processo para produção de etanol utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidas de fermento fresco de
15 panificação, adsorvidas em crisotila tratada e ativada. A primeira etapa no desenvolvimento de tal processo consistiu no tratamento e ativação da crisotila para posterior imobilização das células de *S. cerevisiae*. Cultivos iniciais em batelada em incubador rotativo, com volume de
20 reação de 15 mL de meio de cultivo contendo de 10 a 50% (m/v) de glicose, tiveram duração de 90 a 122 horas e utilizaram células livres e imobilizadas com diferentes relações massa de células/massa de crisotila, para efeito de comparação. Tais ensaios mostraram que o rendimento

final do sistema imobilizado superou o do sistema livre em até 20%, embora o desenvolvimento do processo tenha sido acompanhado pela evolução de CO₂ via pesagem dos *Erlenmeyers*, o que não distingue o CO₂ proveniente do processo fermentativo propriamente dito do CO₂ proveniente da respiração celular. O primeiro cultivo contínuo, desenvolvido em um reator tipo PBR ("packed-bed reactor") encamisado e com volume útil de 1 L, operou com diferentes vazões de alimentação, a 30°C e com duração de 30 dias. Foi utilizado como recheio o complexo células/suporte e esferas de vidro maciço e como meio de cultivo sacarose (20% m/v) com demais nutrientes. Como resultado, determinou-se a vazão de alimentação (2,25 mL/min) que conduzia a maior produtividade (16 g/L.h). O cultivo contínuo seguinte, também com 30 dias de duração, foi desenvolvido nas condições otimizadas e, na média, manteve a produtividade em 16 g/L.h com boa estabilidade operacional. A seguir, novo ensaio no modo contínuo foi realizado empregando-se como recheio o complexo células/suporte e areia bruta. Em tal cultivo, variou-se a vazão de alimentação (1,30 a 4,12 mL/min) e a maior produtividade obtida foi similar àquelas dos ensaios anteriores (16 g/L.h) para uma vazão de alimentação de 2,62 mL/min. Além desses, outros ensaios foram ainda realizados variando-se a temperatura do

processo, onde foi possível constatar que 35°C era a temperatura ótima de fermentação. Como se pode observar, os cultivos em batelada apresentados neste invento utilizaram volume reacional extremamente pequeno (15 mL), empregaram 5 processos prévios de ativação do suporte e de imobilização e foram demasiadamente longos, o que dificulta a implementação industrial da técnica proposta. Diferentemente do pedido de patente PI 9700635-1, na presente invenção a duração dos cultivos em batelada variou 10 de 7 a 14 horas, no máximo, não se utilizou reator com leito fixo e não foi utilizado qualquer processo para imobilização prévia das células às fibras de crisotila.

A patente americana U.S. 4,952,503, intitulada "Process for the production of ethanol", refere-se a um 15 processo para produção de etanol por fermentação contínua de um substrato contendo carboidrato no qual uma corrente do caldo de fermentação é continuamente retirada do fermentador e dividida por centrifugação em uma corrente rica em levedura, que é recirculada para o reator, e uma 20 corrente essencialmente livre de células e rica em etanol. Esta última corrente é submetida a um processo de destilação, gerando uma fração enriquecida em etanol e outra pobre nesta espécie, que é recirculada para a corrente de entrada do reator.

A patente americana U.S. 4,769,324, intitulada "Ethanol production", relata a produção de etanol pela fermentação do melaço na presença de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces castellii*. A *Saccharomyces*
5 *cerevisiae* converte as hexoses do melaço diretamente em etanol e a *Saccharomyces castellii* produz a enzima amilase em meio contendo melaço. A amilase produzida atua sobre o amido e sobre os açúcares de cadeias maiores presentes na porção não fermentescível do meio transformando-os em
10 hexoses, que são convertidas em etanol pela *S. cerevisiae*. Assim, maiores rendimentos em etanol são obtidos a partir de uma dada quantidade de melaço em comparação com outros processos. Deve-se ressaltar, porém, que a *Saccharomyces castellii* que produz a amilase é um mutante que necessita
15 de um laborioso tratamento para a perfeita adaptação das células aos meios contendo melaço.

Assim, ainda há necessidade na técnica de um processo fermentativo para a produção de etanol utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em fibras de
20 crisotila *in natura* em biorreatores pneumáticos de circulação interna de 2, 5 e 10 L de capacidade útil, operados em batelada e em batelada repetida, tal processo sendo descrito e reivindicado no presente pedido.

Sumário da Invenção

De um modo amplo, o processo da invenção para obtenção de etanol por fermentação em presença de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em crisotila em biorreator pneumático de circulação interna compreende as seguintes

5 etapas:

- a) Em um biorreator pneumático ou *airlift*, prover um meio de cultura com glicose ou sacarose como fontes de carbono, com concentrações na faixa de 160 a 300 g/L;
- b) Adicionar ao referido meio uma quantidade de crisotila
10 correspondente a concentrações entre 0,5 e 5% m/v e anti-espumante;
- c) Estabilizar o meio de cultura na temperatura entre 30°C e 35°C com auxílio de água circulando pelo cilindro interno oco do dito biorreator;
- 15 d) Promover a homogeneização do meio reacional, aqui composto por meio de cultura e fibras de crisotila, através da injeção de um gás como CO₂ com vazão específica de 0,3; 0,6 ou 0,9 vvm;
- e) Inocular o dito biorreator com concentração inicial de
20 células de *Saccharomyces cerevisiae* no caldo de fermentação entre 5 e 30 g/L em base seca, fechar o biorreator e iniciar o processo fermentativo;
- f) Manter o dito processo fermentativo por um período de 7 a 14 horas, com pH entre 4,3 e 5,5, onde a imobilização

das células do meio de cultura sobre o suporte de crisotila ocorre concomitantemente ao processo de produção de etanol, recuperando o etanol arrastado com auxílio de um condensador encamisado alocado na tampa do dito biorreator airlift;

g) Finalizar o processo fermentativo quando não mais forem detectados quaisquer resíduos de açúcares no caldo de cultivo;

h) Esgotar o biorreator mantendo as fibras contendo as células imobilizadas e recuperar o vinho delevedurado com concentração final de etanol mais elevada do que seria possível obter mediante processos com células livres; e

i) Analisar o teor de etanol no vinho delevedurado.

Assim, a presente invenção provê um processo para obtenção de etanol com *S. cerevisiae* imobilizada em crisotila em biorreator pneumático de circulação interna.

A presente invenção provê ainda um processo para obtenção de etanol com *S. cerevisiae* imobilizada em crisotila em biorreator pneumático de circulação interna que opera em regime de batelada ou batelada repetida.

A presente invenção também provê um processo de obtenção de etanol com *S. cerevisiae* imobilizada em crisotila em biorreator pneumático onde as células

presentes no caldo de cultura são fisicamente aprisionadas nas fibras de crisotila e a circulação da suspensão dentro do reator é impulsionada por uma corrente de um gás como CO₂.

5 Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 em anexo é um gráfico que ilustra a comparação entre os aumentos percentuais nos rendimentos em etanol obtidos em cultivos empregando diferentes concentrações de crisotila *in natura* (-●-) e ativada (-○-) em relação ao sistema com células livres (0 % m/v).

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção refere-se a um processo fermentativo para a produção de etanol utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em fibras de crisotila *in natura* em biorreatores pneumáticos de 15 circulação interna de 2, 5 e 10 L de capacidade útil operados em batelada e em batelada repetida.

No processo descrito na presente invenção é utilizada crisotila como suporte para imobilização de células de 20 *Saccharomyces cerevisiae*, tendo-se constatado ganhos significativos em termos de produção, produtividade e rendimento em etanol (da ordem de até 15% em comparação com um sistema similar na ausência da crisotila).

Nesse contexto, o processo da invenção propõe a

produção de etanol por leveduras imobilizadas em crisotila em biorreator pneumático do tipo *airlift* ou de "fluxo ascendente de gás" de circulação interna, equipamento objeto do pedido de patente PI 0404703-6 da Requerente e
5 aqui integralmente incorporado como referência, operado na forma descontínua.

Esse biorreator é constituído por dois cilindros concêntricos que geram um espaço anular por onde circula o meio de fermentação que, por sua vez, é impulsionado pelo
10 gás que é injetado por um aspensor instalado na porção inferior do cilindro interno. O cilindro interno tem altura inferior à do cilindro externo e fica completamente imerso no volume de reação, atuando como um trocador de calor para o meio reacional. O aparato é dotado de uma tampa superior,
15 com orifícios para alocação de sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dentre outros, além de um condensador, que retém o etanol arrastado pelo CO₂ gerado durante o cultivo.

A configuração deste biorreator promove circulação
20 eficiente do meio de fermentação contendo células imobilizadas por meio da injeção de CO₂, de modo que ao longo de todo o experimento as células imobilizadas permanecem em contato com o meio nutriente. O biorreator utilizado no presente processo mostra-se robusto, de baixo

custo de construção, operação simples e com dispositivos eficientes de transferência de calor e massa.

No desenvolvimento do presente processo foram avaliados dois meios de cultura com glicose ou sacarose como fontes de
5 carbono, com concentrações na faixa de 160 a 300 g/L.

Além da fonte de carbono, o "meio de cultura 1" apresenta a seguinte composição : ureia (3 g/L) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L).

O "meio de cultura 2" apresenta composição que simula
10 a do melaço de cana-de-açúcar diluído utilizado como matéria-prima na produção industrial de etanol. Além da fonte de carbono, o "meio de cultura 2" apresenta a seguinte composição: ureia (5,32 g/L) e extrato de levedura (6,8 g/L) como fontes de nitrogênio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4 g/L) como fonte
15 de magnésio e KH_2PO_4 (5,6 g/L) como fonte de fósforo e potássio.

Após preparação dos referidos meios, adiciona-se a estes uma quantidade de crisotila correspondente à concentração desejada (de 0,5 a 5% m/v) e anti-espumante. A
20 quantidade de anti-espumante adicionada à suspensão depende do volume do reator a ser utilizado (100, 250 e 500 microlitros (2, 4 ou 6 gotas) para biorreatores de 2, 5 ou 10 L, respectivamente). Os anti-espumantes úteis para a prática da invenção incluem os

siliconados e os não siliconados
(<http://www.silaex.com.br>).

Os cultivos são realizados à temperatura de 30°C até 35°C, controlada por recirculação de água proveniente de
5 banho termostatzado. Esta água circula pelo cilindro interno oco do biorreator, que funciona como trocador de calor.

A mistura do meio reacional é realizada de preferência pela injeção de CO₂ ou N₂ sem estar limitado a estes gases,
10 de preferência de CO₂ proveniente de um cilindro de CO₂ pressurizado e a vazão específica (0,3; 0,6 ou 0,9 vvm, onde "vvm" significa volume de gás por volume de caldo por minuto ou vazão específica de gaseificação) controlada por um fluxômetro de massa.

15 Posteriormente, o biorreator é inoculado com células de *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de fermento de panificação prensado, de forma a perfazer no início do processo uma concentração celular no caldo de fermentação entre 10 e 30 g/L em base seca.

20 Após inoculação, o biorreator é devidamente fechado, iniciando-se o processo fermentativo. Deve-se ressaltar que, contrariamente a processos do estado da técnica, o presente processo dispensa qualquer método para imobilização prévia das células nas fibras de crisotila.

A imobilização das células sobre o suporte de crisotila ocorre concomitantemente ao processo de produção de etanol e não se caracteriza pelo estabelecimento de qualquer tipo de ligação química entre a célula e o
5 suporte, mas apenas pelo aprisionamento físico das células ao suporte sólido, o que ocorre de forma totalmente aleatória à medida que a suspensão circula dentro do reator, impulsionada pela corrente de CO₂. Do ponto de vista de uma possível implementação em escala industrial
10 este procedimento apresenta grandes vantagens frente a outros relatados na literatura, pois não requer etapa prévia de imobilização das células de levedura, o que demanda tempo e, conseqüentemente, incrementa os custos totais do processo.

15 Durante o processo fermentativo ocorre arraste do etanol pelo CO₂, que também é produzido durante o cultivo. Assim, para se recuperar o etanol arrastado, utiliza-se um condensador encamisado alocado na tampa do biorreator *airlift*, mantido à baixa temperatura por meio de circulação
20 de água fria proveniente de um segundo banho termostaticado. Os cultivos têm duração de 7 a 14 horas, dependendo da concentração inicial de substrato oferecida.

Ao final dos processos, quando não mais é detectado qualquer resíduo de açúcares nos caldos de cultivo, a

suspensão é filtrada para separação das fibras contendo as células imobilizadas e obtenção do vinho de levedurado, que é então submetido a uma destilação para avaliação do teor de etanol.

5 Alternativamente, no processo em batelada repetida, o vinho é separado e as células imobilizadas são mantidas no biorreator e participam de uma nova reação em batelada.

Nas três escalas estudadas (2, 5 e 10 L) foram testadas diferentes condições experimentais, variando-se a
10 concentração inicial de fonte de carbono e energia (160 a 300 g/L), a concentração de crisotila (0,5 a 5% m/v) e a vazão específica de alimentação de CO₂ (0,3 a 0,9 vvm).

Em todas as condições avaliadas e nas diferentes escalas, observou-se a superioridade do sistema com células
15 imobilizadas em relação ao sistema tradicional com células livres, com rendimentos de substrato em etanol para o sistema imobilizado até 15% superiores àqueles obtidos no sistema com células livres, nas mesmas condições experimentais.

20 O presente processo será descrito a seguir mediante Exemplos e Tabelas comparativas que não devem, todavia, ser considerados como limitativos da invenção.

No desenvolvimento do processo da invenção foram realizados cultivos em incubador rotativo (*shaker*) e em

biorreatores pneumáticos de circulação interna (*airlift*) de 2 litros, 5 litros e 10 litros de volume útil.

Exemplo 1

Ensaio preliminar são desenvolvidos em incubador rotativo (*shaker*) com o intuito de atingir as condições otimizadas de cultivo, no que diz respeito à concentração inicial de substrato (C_{s_0}), concentração inicial de células (C_{x_0}) e concentração de crisotila (C_{CT}). Em tais ensaios são testadas concentrações celulares de 5 a 30 g/L; volumes de meio de fermentação de 15 a 100 mL; frequências de agitação de 0 a 350 rpm; concentrações de crisotila de 0 a 6,67% (m/v) (*in natura* e ativada por sonicação em ultra-som a 25Hz por 30 minutos para abertura das fibras); pH do meio de fermentação de 4,5 a 5,3, temperatura de 30°C e dois diferentes meios de cultura, aqui denominados "meio de cultura 1" e "meio de cultura 2".

O meio de cultura 1 é similar àquele descrito por Wendhausen, R., "Continuous Fermentation of Sugar Cane Syrup Using Immobilized Yeast Cells", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 91, pp. 48-52, 2001 e é constituído apenas por glicose (200 ou 300 g/L), uréia (3 g/L) e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/L).

O meio de cultura 2, por sua vez, simula a composição do melaço de cana-de-açúcar e apresenta a seguinte

formulação: glicose ou sacarose (200 ou 300 g/L), uréia (5,32 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4 g/L), extrato de levedura (6,8 g/L) e KH_2PO_4 (5,6 g/L).

Nos cultivos realizados na presença da crisotila, as
5 fibras são primeiramente lavadas com água de torneira em
abundância para eliminação do pó e das impurezas
provenientes do seu processo de extração. Após exaustiva
lavagem, as fibras são utilizadas para imobilização
imediate das células ou submetidas ao processo prévio de
10 ativação anteriormente mencionado.

Um fato observado em todos os cultivos realizados em
incubador rotativo é a flotação da crisotila, ou seja, o
 CO_2 gerado pela fermentação alcoólica empurra as fibras
contendo leveduras imobilizadas para a superfície do caldo,
15 reduzindo, assim, o contato dos microrganismos nela
imobilizados com o meio de fermentação. As inúmeras
estratégias utilizadas na tentativa de conferir maior
homogeneidade à suspensão reacional são destituídas de
sucesso de modo que, em geral, o rendimento do sistema
20 livre é sempre superior ao do sistema imobilizado. Ao todo
são realizados 123 cultivos em *Erlenmeyer* em incubador
rotativo, a partir da combinação das diferentes variáveis
citadas acima.

A concentração de açúcares redutores totais (ART) é

avaliada pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS),
vide Chaplin, M. F., "Monosaccharides", em Chaplin, M. F.,
Kennedy, J. F. (eds.): "Carbohydrate Analysis: A Practical
Approach", IRL Press (Oxford, England), pp. 1-36, 1986,
5 após hidrólise ácida com HCl 0,9N a 60°C por 40 minutos. A
concentração de etanol é mensurada pelo método da oxidação
por dicromato de potássio após destilação da amostra.

O rendimento em etanol (%) é calculado pela relação
entre a quantidade de etanol produzida e a quantidade de
10 ART consumida, dividida pelo fator estequiométrico (0,511
 $\frac{g_{\text{etanol}}}{g_{\text{ART}}}$) e multiplicada por 100.

Os principais resultados obtidos nos cultivos
realizados em incubador rotativo não se referem à obtenção
de rendimentos em etanol do sistema imobilizado mais
15 expressivos do que os observados para o sistema livre, mas
à definição do tipo de meio e da fonte de fermento a serem
utilizados em ensaios posteriores, quais sejam, meio de
cultura 2 e fermento adquirido da *Fleischmann Royal*.

Exemplo 2

20 Os cultivos em biorreator *airlift* de 2 L objetivam
avaliar a homogeneidade do meio contendo células de
Saccharomyces cerevisiae imobilizadas em fibras de
crisotila *in natura*, em função da injeção do CO₂ pela base
desse tipo de reator. Espera-se uma melhor circulação da

suspensão e, conseqüentemente, contato ininterrupto das células imobilizadas com o meio de cultivo, o que representa o principal problema detectado nos cultivos em *Erlenmeyer*.

5 Tais cultivos são realizados na ausência e na presença de crisotila, para efeito de comparação, utilizando-se o meio de cultura 2 com a seguinte composição: sacarose, 200 g/L; uréia, 5,32 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,4 g/L; extrato de levedura, 6,8 g/L, e KH_2PO_4 , 5,6 g/L. Outros parâmetros
10 também são mantidos fixos, a saber: $Cx_0=10$ g/L, $\phi_{CO_2}=0,3$ vvm, tempo de cultivo de 9 horas, temperatura de 30°C e pH=5,3. São manipulados a concentração (de 0 a 4% m/v) e o tipo de crisotila (*in natura* ou ativada) de modo a maximizar o rendimento em etanol. No total, são realizados
15 19 cultivos em biorreator *airlift* de 2 L (3 com células livres, 12 com células imobilizadas em crisotila *in natura* e 4 com células imobilizadas em crisotila ativada).

A concentração de açúcares redutores totais (ART) é avaliada pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS),
20 vide Chaplin, M. F., "Monosaccharides", em Chaplin, M. F., Kennedy, J. F. (eds.): "Carbohydrate Analysis: A Practical Approach", IRL Press (Oxford, England), pp. 1-36, 1986, após hidrólise ácida com HCl 0,9N a 60°C por 40 minutos. A concentração de etanol é obtida utilizando-se o método da

oxidação por dicromato de potássio após destilação da amostra. O rendimento em etanol (em %) é calculado pela relação entre a quantidade de etanol produzida e a quantidade de ART consumida, dividida pelo fator estequiométrico ($0,511 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{ART}}$) e multiplicada por 100.

Para fins comparativos, a Tabela 1 a seguir apresenta os valores dos aumentos percentuais dos rendimentos em etanol dos sistemas imobilizados em relação aos sistemas livres nas mesmas condições de cultivo.

Em todos os ensaios realizados com células imobilizadas são obtidos rendimentos em etanol superiores aos dos sistemas com células livres nas mesmas condições de cultivo. Contudo, o resultado mais expressivo (aumento em torno de 11% no rendimento em etanol) é obtido quando é empregada 3% (m/v) de crisotila *in natura* (resultado em destaque na Tabela 1 abaixo).

Tabela 1

Concentração de Crisotila (% m/v)	Aumento do rendimento em etanol (%)		
	Células Livres*	Crisotila <i>in natura</i> *	Crisotila Ativada
0	0,00 ± 1,06	-	
1	-	10,52 ± 0,78	2,66

2	-	10,56 ± 0,30	5,50
3	-	11,14 ± 0,59	5,50
4	-	8,00 ± 0,09	1,27

* Ensaio realizado em triplicata.

Para fins comparativos, a Figura 1 ilustra os aumentos percentuais de rendimento em etanol para os sistemas com crisotila ativada e *in natura*, em relação ao sistema com células livres, obtidos com os valores da Tabela 1. Embora os resultados obtidos com crisotila ativada sejam superiores aos obtidos com células livres, estes são inferiores aos observados com crisotila *in natura*. Por essa razão, sistemas empregando crisotila ativada são definitivamente descartados, sendo a crisotila *in natura* utilizada na continuidade das pesquisas que levaram a Requerente aos presentes resultados.

Exemplo 3

A relevância dos resultados obtidos em biorreator *airlift* de 2 L, do ponto de vista do rendimento em etanol, motivou o estudo de novas concentrações iniciais de substrato, vazões de CO₂ e concentrações de crisotila (*in natura*), bem como o estudo do aumento de escala, de um

bioreator *airlift* de 2 L para um de 5 L. Para tal, é definido um conjunto de condições experimentais obedecendo a um planejamento fatorial (2^3 com sextuplicata do ponto central). Para cada ensaio com microrganismo imobilizado, realiza-se um correspondente com células livres para fins comparativos, totalizando 19 cultivos.

Na Tabela 2 estão apresentadas as variáveis manipuladas bem como seus limites inferior e superior para execução do planejamento fatorial em bioreator de 5 L de capacidade útil.

Tabela 2

Cs_0 (g/L)	ϕ_{CO_2} (vvm)	C_{cr} (% m/v)
160 (-)	0,3 (-)	1,0 (-)
200* (0)	0,6* (0)	2,5* (0)
240 (+)	0,9 (+)	4,0 (+)

*Condição definida como ponto central: ensaios em sextuplicata.

Inicialmente, são realizados cultivos no bioreator *airlift* de 5 L com crisotila *in natura* previamente lavada com água. Durante o procedimento de lavagem, verifica-se na água de lavagem o desprendimento de grande quantidade de fibrilas a partir das fibras maiores. Tendo em vista que de acordo com a literatura, as células de *Saccharomyces*

cerevisiae aderem-se preferencialmente às fibrilas, optou-se por não mais proceder com a operação de lavagem das fibras antes do uso para evitar perdas significativas das fibrilas. Os resultados obtidos em cultivos-teste após esta
5 alteração no protocolo de operação mostram um incremento no rendimento final em etanol em comparação com ensaios realizados com a crisotila lavada.

A Tabela 3 apresenta os valores dos aumentos percentuais dos rendimentos em etanol (%) dos sistemas
10 imobilizados em relação aos sistemas livres e de acordo com condições experimentais definidas no planejamento fatorial 2^3 . Cada linha da Tabela 3 informa os aumentos percentuais dos sistemas imobilizados em relação ao sistema livre nas mesmas condições experimentais (Cs_0 e ϕ_{CO_2}). Na coluna
15 "células livres" estão informados os aumentos percentuais em relação ao menor valor obtido nesse sistema, no caso, na seguinte condição: $Cs_0=200$ g/L e $\phi_{CO_2} = 0,6$ vvm.

Avaliando-se globalmente os resultados obtidos utilizando-se biorreator *airlift* de 5 L (Tabela 3) pode-se
20 observar que em todos os cultivos realizados com microrganismo imobilizado em fibras de crisotila são obtidos rendimentos em etanol superiores aos obtidos com células livres, de modo similar ao observado no *airlift* de

2 L. O melhor resultado (com rendimento em etanol em torno de 7% superior ao do sistema livre) é obtido quando se utiliza $C_{S_0}=160$ g/L, $\phi_{CO_2}=0,9$ vvm e $C_{CT}=4\%$ (m/v) (destaque na Tabela 3).

5 Tabela 3

Condição de Cultivo	Concentração de Crisotila (% m/v)			
	0 (células livres)	1	2,5	4
$C_{S_0}=160$ g/L $\phi_{CO_2}=0,3$ vvm	0,77	3,76	-	7,02
$C_{S_0}=160$ g/L $\phi_{CO_2}=0,9$ vvm	2,88	5,33	-	7,19
$C_{S_0}=200$ g/L $\phi_{CO_2}=0,6$ vvm	0,00	---	1,09*	-
$C_{S_0}=240$ g/L $\phi_{CO_2}=0,3$ vvm	2,96	1,17	-	4,22
$C_{S_0}=240$ g/L $\phi_{CO_2}=0,9$ vvm	5,25	1,16	-	2,71

* Ensaio realizado em sextuplicata.

Exemplo 4

Este Exemplo relata os cultivos realizados utilizando-se um biorreator *airlift* com volume útil de 10

L. Nesses ensaios é possível avaliar a reprodutibilidade dos dados no aumento de escala (de 5 para 10 L), utilizando-se para tal o mesmo planejamento fatorial empregado no biorreator de 5 L e idênticas condições experimentais.

A Tabela 4 a seguir apresenta os valores dos aumentos percentuais dos rendimentos em etanol (%) dos sistemas imobilizados em relação aos sistemas livres obtidos nos cultivos em biorreator de 10 L. Cada linha da Tabela 4 informa os aumentos percentuais dos sistemas imobilizados em relação ao sistema livre nas mesmas condições experimentais (C_{s_0} e ϕ_{CO_2}). Na coluna "células livres" estão informados os aumentos percentuais em relação ao menor valor obtido nesse sistema, no caso, na seguinte condição: $C_{s_0}=160$ g/L e $\phi_{CO_2} = 0,9$ vvm.

Os resultados obtidos confirmam a reprodutibilidade dos experimentos anteriormente realizados em reator de 5 L, visto que o melhor resultado é obtido nas mesmas condições experimentais ($C_{s_0}=160$ g/L, $\phi_{CO_2}=0,9$ vvm e $C_{CT}=4\%$ m/v) e de acordo com condições experimentais definidas no planejamento fatorial 2^3 . No entanto, neste caso, o sistema imobilizado supera o sistema livre, em termos de rendimento final em etanol, em aproximadamente 15% (destaque na Tabela

4).

Tabela 4

Condição de Cultivo	Concentração de Crisotila (% m/v)			
	0 (células livres)	1	2,5	4
$CS_0=160$ g/L $\phi_{CO_2}=0,3$ vvm	7,27	0,45	-	2,67
$CS_0=160$ g/L $\phi_{CO_2}=0,9$ vvm	0,00	11,64	-	14,62
$CS_0=200$ g/L $\phi_{CO_2}=0,6$ vvm	7,42	---	6,65*	-
$CS_0=240$ g/L $\phi_{CO_2}=0,3$ vvm	7,14	6,07	-	7,42
$CS_0=240$ g/L $\phi_{CO_2}=0,9$ vvm	7,00	6,55	-	7,68

* Ensaios realizados em triplicata.

Após realização dos cultivos referentes ao planejamento experimental, os dados obtidos são estatisticamente tratados, obtendo-se um modelo que descreve o aumento percentual do rendimento em etanol em função das variáveis independentes avaliadas (CS_0 , ϕ_{CO_2} e C_{CT}). As condições otimizadas de cultivo que teoricamente

conduzem ao melhor rendimento em etanol são encontradas ($C_{S_0}=240$ g/L, $\phi_{CO_2}=0,88$ vvm e $C_{CT}=2,74\%$ m/v).

Assim, dois novos cultivos são realizados, um com células imobilizadas e outro com células livres para efeito de comparação, sendo que os resultados obtidos comprovam a superioridade do sistema imobilizado frente ao livre.

Exemplo 5

Determinadas as condições otimizadas de cultivo (Exemplo 4), posteriormente são realizados cultivos em bateladas repetidas. No entanto, nesses cultivos é utilizada uma concentração inicial de substrato de 200 g/L. A explicação para esta mudança experimental é que, apesar de ser possível esgotar todo o substrato quando se utiliza $C_{S_0}=240$ g/L, reduz-se consideravelmente a produtividade do sistema, ou seja, o tempo total de cultivo é bem superior às 9 horas que vêm sendo normalmente requeridas nos demais cultivos. Assim, o cultivo inicial das bateladas repetidas é realizado com $C_{S_0}=200$ g/L, $\phi_{CO_2}=0,88$ vvm, $C_{CT}=2,74\%$ (m/v) e $C_{x_0}=10$ g/L. O consumo total de substrato se dá em 9 horas, como esperado, obtendo-se um aumento percentual no rendimento em etanol em relação ao sistema livre de 4,32% e uma produtividade de 11,46 g/L.h.

Concluída a primeira batelada, o vinho fermentado é

retirado do biorreator por gravidade e as fibras contendo células imobilizadas mantidas em seu interior. Após esgotamento, nova quantidade de meio de cultivo é alimentada ao reator, tendo início a segunda batelada. Este

5 segundo cultivo tem uma duração de 14 horas para completo esgotamento do substrato inicial oferecido, tendo-se alcançado um aumento percentual no rendimento em etanol em relação ao sistema livre de 4,70%, com produtividade de 7,13 g/L.h. Concluída a segunda batelada, o mesmo

10 procedimento de esgotamento e recarga do reator é utilizado, partindo-se para o terceiro ensaio consecutivo. Este cultivo tem duração de 21 horas até que todo o substrato seja consumido. O aumento percentual no rendimento em etanol em relação ao sistema livre atingido é

15 de 4,74% e a produtividade de 5,61 g/L.h. Com esses resultados, observa-se que o sistema de imobilização aqui empregado é eficiente, mas que em consequência da dificuldade de se determinar a concentração final de células aderidas ao suporte após cada cultivo, não se pode

20 garantir que a concentração inicial de células em todos os ensaios tenha sido exatamente igual. Para contornar o problema de lavagem de células durante o esgotamento do biorreator, as células retiradas poderiam ser separadas por centrifugação e retornar ao reator, diminuindo o tempo de

cultivo e aumentando a produtividade do processo.

Com base nos cinco Exemplos apresentados acima, pode-se afirmar que o processo da invenção para a produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae* immobilizada em crisotila gera rendimentos em etanol superiores àqueles obtidos no processo tradicional, que não faz uso de crisotila, e que tal superioridade do sistema immobilizado em termos de rendimento em etanol se mantém com o aumento de escala.

10 Além disso, verifica-se que diferentes métodos de operação do biorreator *airlift* conduzem sempre a rendimentos superiores dos sistemas immobilizados frente ao livre, o que mostra a grande versatilidade/viabilidade do processo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em crisotila in natura em biorreator pneumático de circulação interna **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

j) em um biorreator pneumático dotado de cilindro interno oco para circulação de água, prover um meio de cultura com glicose ou sacarose como fontes de carbono, com concentração nesta faixa de 160 a 300 g/L;

k) adicionar ao referido meio uma quantidade de crisotila in natura correspondente a concentrações entre 0,5 e 5% m/v e anti-espumante; sendo que as fibras de crisotila são preparadas por lavagem abundante com água, seguida de imobilização imediata das células;

l) estabilizar o meio de cultura na temperatura entre 30°C e 35°C com auxílio de água circulando pelo cilindro interno oco do dito biorreator;

m) promover a homogeneização do meio reacional composto por meio de cultura e fibras de crisotila, através da injeção de gás com vazão específica de 0,3; 0,6 ou 0,9 vvm;

n) inocular o dito biorreator com concentração inicial de células de *Saccharomyces cerevisiae* no caldo de fermentação entre 5 e 30 g/L em base seca, fechar o biorreator e iniciar o processo fermentativo;

o) manter o dito processo fermentativo por um período de 7 a 14 horas, com pH de 4,3 a 5,5, onde a imobilização das células do meio de cultura sobre o suporte de crisotila ocorre concomitantemente ao processo de produção de etanol, recuperando o etanol arrastado com auxílio de um condensador encamisado alocado na tampa do dito biorreator pneumático de circulação interna;

p) finalizar o processo fermentativo quando não mais forem detectados quaisquer resíduos de açúcares no caldo de cultivo;

q) esgotar o biorreator mantendo as fibras contendo as células imobilizadas e recuperar o vinho delevedurado com concentração final de etanol mais elevada do que seria possível obter mediante processos com células livres; e

r) analisar o teor de etanol no vinho delevedurado.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** alternativamente operar em regime de batelada repetida.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato do meio de cultura ser constituído de 3 g/L de ureia e 0,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato do meio de cultura ser alternativamente constituído de 5,32 g/L de ureia, 6,8 g/L

de extrato de levedura, 1,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5,6 g/L de KH_2PO_4 .

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato da quantidade de anti-espumante ser de 100, 250 ou 500 microlitros conforme for utilizado um biorreator de 2L, 5L ou 10L, respectivamente.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato do gás utilizado para homogeneização do conteúdo do reator ser CO_2 ou N_2 .

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato do gás utilizado para homogeneização do conteúdo do reator ser CO_2 .

FIG. 1

