



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

(21) BR 10 2012 019454-6 A2



\* B R 1 0 2 0 1 2 0 1 9 4 5 4 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 19/07/2012  
(43) Data da Publicação: 26/08/2014  
(RPI 2277)

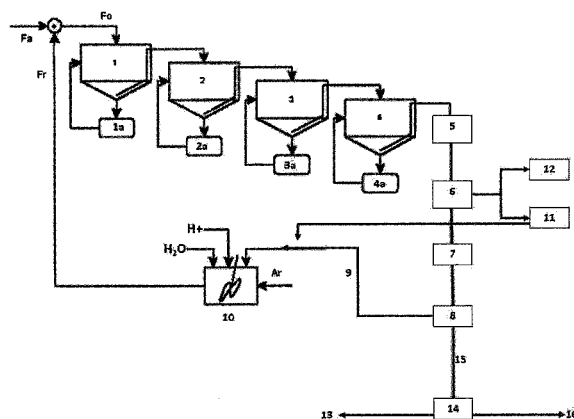
(51) Int.Cl.:  
C12P 7/06  
C12N 1/06

(54) Título: PROCESSO DE SEPARAÇÃO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, Icc Industrial Comércio Exportação e Importação

(72) Inventor(es): Anderson Ferreira da Cunha, Glycon Duarte Santos, Maria Augusta Sabadine

(57) Resumo: PROCESSO DE SEPARAÇÃO E SELAÇÃO DE LEVEDURAS PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA. É descrito um processo de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica que compreende, após a primeira centrifugação em (6), enviar o vinho separado para um tanque pulmão (13) e daí via L14 para o processo (14) de centrifugações em série com pelo menos duas centrifugações crescentes de pelo menos 400 rpm até 5000 rpm onde o sobrenadante de cada centrifugação se torna a carga da centrifugação seguinte e o precipitado é coletado, obtendo leveduras jovens sendo retornadas após diluição com água e fermentação, as leveduras jovens separadas e selecionadas e produtos de fermentação, as leveduras jovens sendo retornadas após diluição com água e tratamentos convencionais para os tanques de fermentação (Fr). Após destilação, a vinhaça (17) separada apresenta teor de material orgânico inferior ao teor da vinhaça resultante de processos de produção de etanol industrial do estado da técnica que utilizam uma única centrifugação.



## **PROCESSO DE SEPARAÇÃO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção pertence ao campo dos processos de  
5 separação e seleção de leveduras úteis para a produção de etanol  
industrial, mais especificamente, a um processo de separação e seleção  
de leveduras que emprega centrifugações em série para o melhor  
aproveitamento de leveduras jovens, que são inseridas no sistema  
fermentativo da fermentação alcoólica destinada à produção de álcool  
10 industrial em vez de serem misturadas à corrente de vinhaça a ser  
descartada.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

O etanol vem sendo utilizado durante os últimos anos como uma  
importante fonte de energia alternativa e renovável na substituição dos  
15 combustíveis fósseis. Este biocombustível pode ser produzido a partir da  
fermentação do milho, cevada, trigo, beterraba e cana-de-açúcar. Entre  
estes, a cultura de cana de açúcar, largamente cultivada no Brasil,  
desponta como a matéria-prima mais economicamente viável, pois além  
de ser rica em açúcares fermentáveis, é muito favorecida pelas  
20 condições climáticas e geográficas de nosso país.

O Brasil foi pioneiro na adoção de um programa nacional de  
produção de etanol de cana-de-açúcar (Proálcool) como fonte alternativa  
de energia após o primeiro choque na oferta de petróleo durante os anos  
70. Hoje o Brasil desponta como principal país a se beneficiar com a  
25 expectativa de que vários outros países venham a adotar o etanol de  
cana de açúcar como um dos substitutos dos combustíveis fósseis.

A obtenção do etanol industrial se dá principalmente pela via  
fermentativa, que ocorre em dornas de fermentação após a adição de  
uma mistura composta de mosto (caldo de cana-de-açúcar ou xarope

diluído) e leveduras. Após o término da fermentação, o caldo fermentado é centrifugado para separação do vinho (mosto fermentado) do leite de leveduras, nome dado ao caldo de leveduras que sai da centrifugação,. O primeiro segue para as torres de destilação enquanto as leveduras  
5 retornam ao processo fermentativo. Após a destilação, a vinhaça (resíduo da destilação do etanol) é distribuída na cultura de cana de açúcar, pois tem um importante valor como adubo (fonte de potássio) nas plantações de cana.

Já o leite de levedura passa por tratamento com ácido sulfúrico  
10 para diminuir o número de bactérias contaminantes e retorna à dorna de fermentação, na qual será adicionada uma nova carga de mosto para um novo ciclo fermentativo.

Este processo pode acontecer tanto de forma contínua quanto na forma de batelada.

15 Na fermentação contínua o volume de levedura e mosto são controlados no início e no fim do processo, para que se mantenha uma relação de equilíbrio entre a quantidade de açúcar fermentável e a população de leveduras.

Já no processo de batelada, todo o mosto é fermentado e em  
20 seguida centrifugado.

A Figura 1 é um fluxograma que ilustra o processo contínuo de produção industrial conforme é atualmente praticado na técnica.

Conforme esta Figura, a primeira dorna (**1**) é alimentada (**Fa**) com melaço diluído (**Fo**) para aproximadamente 10% de sacarose. Na mesma  
25 dorna são adicionadas as leveduras (**Fr**) que farão a conversão da sacarose em etanol.

Conforme a fermentação ocorre, todo o líquido é transportado para  
outras dornas, nas quais a fermentação segue diminuindo a concentração de açúcar e aumentando a concentração de etanol (**L2a-**

**L4a).** Em todas as etapas a temperatura das dornas deve ser controlada para permanecer próxima a 30°C (**1a-4a**).

Ao término do processo fermentativo, o meio fermentado (**L5, 5**) é enviado a centrifugação (**L6, 6**) para a separação do leite de levedura (**L10**) do vinho de levedurado (**L7, 7**) e será levado para as torres de destilação (**L9**) nas quais ocorre a destilação do etanol (**9**) e a produção da vinhaça (**L8, 8**) que é utilizada como produto para fertilização de áreas plantadas.

O leite de levedura é enviado para tanques de tratamento (10) no qual sofre uma diluição com água ( $H_2O$ ) e um tratamento ácido ( $H^+$ ), antes de retornar ao processo (**Fr**).

O reaproveitamento de leveduras é um procedimento economicamente importante para a usina e um dos principais diferenciais entre a produção do Brasil e outros produtores mundiais, que normalmente não operam com o reciclo da cultura de leveduras. Isto porque a produção de um novo fermento iniciador com a quantidade de massa celular adequada resultaria em um grande consumo de açúcar, o que torna o processo demorado e eleva os custos de produção.

Uma observação importante é que apesar de a levedura original ser inoculada em altas concentrações, em algumas usinas ela pode ser substituída por leveduras selvagens durante o processo de fermentação, que se mantêm até o final da safra. Em muitos casos, essa substituição não era nem mesmo notada, não havendo queda na produtividade da usina, possivelmente por serem as leveduras “invasoras” mais bem adaptadas às condições de fermentação.

Durante os últimos anos diversos grupos de pesquisa se empenharam em isolar linhagens de leveduras que se mantêm ao longo da fermentação. Uma característica comum entre cepas de leveduras selecionadas e cepas de leveduras selvagens e dominantes é que estas

têm uma taxa de multiplicação celular mais intensa que as outras cepas de levedura eventualmente presentes na dorna de fermentação, o que favorece o domínio do meio fermentativo por estas cepas.

Este aumento na proliferação de leveduras, aliado à  
5 implementação de técnicas de assepsia, refletiu em um aumento significativo de massa de leveduras ao final do processo fermentativo, e na obtenção de leite de leveduras muito mais concentrado, fazendo com que se tornasse comum o procedimento de “sangria”, no qual uma quantidade de leveduras é retirada para manter a concentração celular  
10 ideal de leveduras durante o processo fermentativo.

Quando “sangrado”, este excedente de leveduras é seco e comercializado como ingrediente para ração animal. Dados coletados em diversas usinas mostram que para cada 1,0 m<sup>3</sup> de etanol produzido é possível a produção de 20,0 kg de levedura seca.

15 A centrifugação do mosto fermentado ainda permite a perda de importantes quantidades de levedura para o vinho a ser destilado. Análises realizadas no vinho “delevedurado” (centrifugado) evidenciam que, mesmo após a centrifugação, ainda é possível encontrar um número elevado de leveduras neste líquido, com uma contagem de células  
20 viáveis de aproximadamente 10<sup>7</sup> células por ml de vinho.

Outra observação importante diz respeito ao tamanho das leveduras presentes no vinho “delevedurado”. As células destas leveduras são menores do que as presentes no leite de levedura oriundo da primeira centrifugação.

25 Esta informação leva à suposição de que as leveduras encontradas no vinho são mais jovens que as do leite de levedura originado na primeira centrifugação.

Como amplamente conhecido na literatura, as leveduras podem se dividir de forma sexuada ou assexuada. Na reprodução assexuada, que

é a principal forma de reprodução encontrada nas dornas de fermentação, as células se dividem por brotamento (Figura 2A). Neste contexto, sua idade pode ser mensurada de acordo com as cicatrizes observadas em sua parede celular (Figura 2B).

5 Assim, quanto maior for o número de cicatrizes, mais velho é o microrganismo e conseqüentemente menor é seu potencial fermentativo.

Desta forma, a levedura “filha” que brota da levedura “mãe”, após a citocinese ativa diversas vias de metabolismo celular que desencadeiam processos intracelulares que ativarão o crescimento e proliferação celular tornando essa célula ávida pelo processo fermentativo.

Esta diferença de tamanho faz com que ocorra uma diferença na separação durante o processo de centrifugação, levando as leveduras maiores e, portanto mais velhas, a sedimentarem com maior facilidade.

Além disso, ao final do processo fermentativo, onde as condições de estresse são altas, algumas células começam a se agregar em um processo conhecido como floculação. Esse fenômeno, que é um dos problemas mais graves e prejudiciais ao rendimento fermentativo durante a fermentação do etanol, ocorre devido à produção de uma proteína de membrana chamada floculina, que tem a capacidade de se ligar a carboidratos presentes na membrana de todas as leveduras, denominada lectina (vide Figura 3A, levedura não floculante, e Figura 3B, levedura floculante).

Com a produção destas proteínas, as leveduras se agregam, sedimentando com maior facilidade durante o processo fermentativo e diminuindo a eficiência do processo.

Além disso, durante a transferência entre os tanques no processo de produção de etanol industrial, estas leveduras formam aglomerados que causam entupimentos nos canos de transferência, fazendo com que muitas vezes o processo fermentativo tenha que ser interrompido, todos

os tanques submetidos a assepsia e só após esta limpeza, o processo pode ser reiniciado.

Como as usinas no Brasil trabalham com reciclo de leveduras, o processo atualmente empregado favorece que leveduras mais velhas e floculadas sejam as leveduras selecionadas para retornarem a um novo ciclo fermentativo, enquanto as células mais jovens e com potencial fermentativo superior, por serem menores, sejam levadas juntamente com o vinho a ser destilado, sendo mortas com o calor durante o processo de destilação para a obtenção do etanol e posteriormente descartadas juntamente com a vinhaça.

Observa-se que o montante de levedura presente na vinhaça é de cerca de 40,0 e 50,0 kgs de levedura (base seca) por m<sup>3</sup> de etanol destilado.

A presença de leveduras no vinho a ser destilado, e por consequência, na vinhaça após a destilação, causa um severo agravamento da deposição de material orgânico na vinhaça, contribuindo para o aumento significativo do DBO (Deficiência Bioquímica de Oxigênio).

Os níveis de produção de vinhaça são muito elevados, superando a necessidade de adubação nos campos, e por isso, este composto passa a ter um alto potencial poluidor, sendo cerca de cem vezes maior que o esgoto doméstico se lançada diretamente nos corpos d'água.

Na literatura de patentes os processos que fazem uso de uma segunda centrifugação o fazem com o objetivo de secagem de leveduras para comercialização, como por exemplo, o encontrado no pedido brasileiro publicado BR9100062-9 A2.

Além disso, o processo de centrifugação é feito utilizando a vinhaça, o que inviabiliza o re-uso deste microrganismo que foi morto durante o processo de destilação.

Outros processos utilizam a filtração como meio de concentração de vinhaça (vide pedido brasileiro publicado BR0805597-1A), no entanto novamente na vinhaça, o mesmo argumento explicitado acima sendo aplicável.

5 Na patente U.S. 4.287.303 os inventores propõem o uso da centrifugação seriada para separar resíduos sólidos provenientes da fermentação e enriquecer o substrato que volta ao fermentador. Nesse caso as centrifugações são feitas sempre nas mesmas velocidades e não ocorre uma separação das leveduras por  
10 tamanho/viabilidade/idade/atividade celular tal como proposto na presente invenção.

Seria interessante portanto que a técnica dispusesse de processo de separação e seleção de leveduras para a produção de etanol industrial com reaproveitamento de leveduras jovens através de  
15 centrifugação seriada, com expressivas vantagens tanto do ponto de vista econômico para a usina quanto para o meio ambiente, pela redução do requisito de DBO da vinhaça a ser descartada no ambiente.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

De um modo amplo, o processo aperfeiçoado de separação e  
20 seleção de leveduras para a produção de etanol industrial a partir de uma carga de sacarose fermentada com auxílio de leveduras compreende as etapas de:

- a) após a primeira centrifugação **(6)**, separar e armazenar em tanques **(11, 12)**, as leveduras mais velhas e  
25 floculadas para secagem, obtendo um vinho;
- b) enviar via a linha **(L13)** o vinho da etapa a) para um Tanque pulmão **(13)**;
- c) a partir do Tanque **(13)** dirigir o vinho via **(L14)** para o processo de centrifugações em série **(14)**, com pelo



- 5 menos duas centrifugações de rotações crescentes de pelo menos 400 rpm até 5000 rpm onde o sobrenadante de cada centrifugação se torna a carga da centrifugação seguinte e o precipitado é coletado, obtendo leveduras jovens separadas e selecionadas e produtos de fermentação;
- 10 d) dirigir ditas leveduras jovens e de alta capacidade fermentativa da etapa c) para o tanque de tratamento **(10)** via **(L15)** para diluição com água e tratamento ácido convencionais;
- e) retornar via **(L19)** as ditas leveduras diluídas e tratadas da etapa d) para os tanques de fermentação **(Fr)**;
- 15 f) separar, por destilação, os produtos de fermentação em vinho **(15)**, álcool industrial **(16)** e vinhaça **(17)** com teor de material orgânico inferior ao teor da vinhaça resultante de processos de produção de etanol industrial do estado da técnica que utilizam uma única centrifugação; e
- g) secar adicionalmente leveduras no tanque **(13)** e embalar o excedente da levedura proveniente das diversas
- 20 centrifugações.

Assim, a invenção provê um processo aperfeiçoado de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica que através de múltiplas centrifugações em velocidades crescentes após o processo fermentativo inicial otimiza a separação das leveduras jovens que

25 retornam ao processo fermentativo, ficando nas primeiras centrifugações as leveduras mais velhas e floculadas que serão secas e comercializadas.

A invenção provê ainda um processo aperfeiçoado de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica que contempla a adição

de leveduras provindas de várias centrifugações para manter a concentração celular de leveduras adequada ao processo.

5 A invenção provê também um processo de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica que permite que a vinhaça resultante do processo de fermentação alcoólica utilizando as leveduras separadas e selecionadas tenha teor de material orgânico inferior àquele produzido através de processos de fermentação alcoólica do estado da técnica.

10 A invenção provê ainda um processo de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica que permite que a vinhaça resultante do processo de fermentação alcoólica utilizando as leveduras separadas e selecionadas tenha poder de poluição de corpos d'água reduzido, por conter menor teor de material orgânico que a vinhaça produzida por processos do estado da técnica.

15 A invenção provê adicionalmente um processo de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica de grande economicidade para a fermentação alcoólica destinada à produção de álcool industrial pela recuperação das células jovens de leveduras, reduzindo o custo global em relação a processos fermentativos do estado da técnica que praticam uma única centrifugação.

A invenção provê ainda um processo de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica que compreende separar células floculantes de não floculantes.

25 A invenção provê também um processo de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica dirigido para a seleção de leveduras com alto potencial fermentativo.

A invenção provê adicionalmente um processo de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica capaz de limpar/reduzir

(selecionar somente as células não floculantes) as células floculantes e indesejáveis para o processo.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

5 A FIGURA 1 anexa é um fluxograma que mostra o processo de produção de álcool industrial por fermentação de um caldo de melaço conforme o estado da técnica.

A FIGURA 2 anexa é uma microfotografia que mostra as células de levedura que se dividem por brotamento. Figura 2A: divisão das células. Figura 2B, cicatrizes da parede celular da levedura.

10 A FIGURA 3 anexa é uma representação esquemática da agregação (floculação) de células de levedura. Figura 3A: levedura não floculante. Figura 3B: levedura floculante.

A FIGURA 4 anexa é um fluxograma do processo da invenção para um processo fermentativo dirigido para a seleção de leveduras com alto potencial fermentativo.

15 A FIGURA 5 anexa é um diagrama de blocos mostrando, para a técnica atualmente empregada (1) e para as várias velocidades de centrifugação (2- 400rpm; 3- 1000 rpm e 4-4000 rpm), a porcentagem de leveduras precipitadas e sobrenadantes. A: leveduras precipitadas. B: leveduras sobrenadantes. Figura 5A: para leveduras floculantes. Figura 5B: para leveduras não floculantes. Figura 5C: para leveduras floculantes e não floculantes (mistura 1:1 p/p).

25 A FIGURA 6 anexa é uma série de micrografias que mostra o aspecto do precipitado e sobrenadante de leveduras para a condição controle de uma centrifugação a 3000 rpm e o aspecto do precipitado e sobrenadante para as condições de centrifugação seriada da invenção. As micrografias se referem a misturas 50:50 de leveduras floculantes e não floculantes. Figura 6A e Figura 6B precipitado e sobrenadante para a condição controle. As Figuras 6C e 6D são micrografias respectivamente

de sobrenadante e precipitado para leveduras centrifugadas a 400 rpm na primeira de uma série de três centrifugações conforme a invenção. As Figuras 6E e 6F são micrografias respectivamente de sobrenadante e precipitado para leveduras centrifugadas a 1000 rpm na 2ª centrifugação conforme a invenção e as Figuras 6G e 6H são micrografias respectivamente de sobrenadante e precipitado para leveduras centrifugadas a 4000 rpm na 3ª centrifugação serial conforme a invenção.

A FIGURA 7 anexa mostra duas micrografias de leveduras obtidas no precipitado (Figura 7A) e no sobrenadante (Figura 7B) de células não floculantes centrifugadas a 400 rpm.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A invenção trata pois de um processo de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica a partir da fermentação de mosto em presença de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* através de centrifugações em série do caldo fermentativo que já sofreu uma primeira centrifugação em um processo de produção de álcool industrial, para a separação de leveduras jovens e reinserção das mesmas na fermentação para obter álcool com rendimento elevado enquanto menos leveduras são perdidas para a vinhaça.

O presente pedido visa uma alteração no *layout* do processo fermentativo atualmente utilizado nas usinas de produção de etanol industrial, através da agregação de processo de centrifugação em série, iniciando por centrifugações de menor velocidade seguidas de centrifugações de velocidades maiores, anteriores ao envio do vinho ao processo de destilação.

A centrifugação em série do caldo fermentado permite: (i) a separação das leveduras maiores e floculadas nos primeiros passos de centrifugação, limpando o sistema destes microrganismos e os enviando

para secagem; (ii) seleção de leveduras jovens e com alta capacidade fermentativa; e (iii) redução do material orgânico na vinhaça contribuindo para diminuição do DBO.

Assim o processo é capaz de segregar a população de leveduras por “tamanho/peso/idade/atividade fermentativa”.

Por ser mais jovem, a levedura originada a partir da segunda centrifugação apresenta características de *performance* fermentativa superiores à da levedura originada da primeira centrifugação.

Esta levedura é enviada aos tanques de tratamento e em seguida às dornas de fermentação, aumentando a eficiência fermentativa das usinas, reduzindo o nível de infecção na dorna, e evitando os processos de floculação da levedura, além de diminuir de modo significativo a presença de leveduras no vinho fermentado.

Como consequência desse processo, o DBO da vinhaça é reduzido, uma vez que as leveduras estão em número reduzido nesse líquido, diminuindo o impacto negativo da vinhaça sobre o meio ambiente.

A centrifugação em série é aplicada com a adição de pelo menos mais uma linha de centrífugas em relação ao número usual de centrífugas (pelo menos duas centrifugações em série).

Na primeira centrifugação, lenta (pelo menos 400 rotações por minuto), são separadas as leveduras mais velhas e floculadas e portanto menos eficientes, seguida de centrifugações mais aceleradas (1000 e 2000 rpm consecutivamente), até a última centrifugação que, conforme uma modalidade do presente pedido, é de 4000 rpm nos experimentos efetuados. Velocidades centrifugação de até 5000 rpm são aceitáveis para o presente processo.

Deve ficar claro para os especialistas que os valores exatos das velocidades de centrifugação podem variar dentro de amplos limites e

que tais valores não são restritos aos valores experimentais citados no presente relatório.

A concentração de leveduras jovens é incrementada de acordo com o aumento da velocidade, sendo que na última centrifugação as leveduras jovens são selecionadas para retornarem ao processo fermentativo e caso necessário incrementadas com leveduras retiradas nas centrifugações anteriores, sob a condição de isto ser efetuado a partir da centrifugação de maior velocidade para a de menor velocidade.

. Como as leveduras jovens da última centrifugação são em número reduzido, se não forem suficientes serão complementadas por leveduras provenientes de outras centrifugações, sempre mais jovens do que as leveduras descartadas.

Vantajosamente, o reaproveitamento das leveduras presentes no vinho após o processo fermentativo contribui em dois aspectos importantes, o econômico (maior rendimento fermentativo e maior produção de levedura seca) e o ambiental (redução do DBO da vinhaça).

Do ponto de vista econômico, essas leveduras retornam aos tanques de fermentação, sendo usadas no processo de fermentação de forma isolada, ou mesmo mescladas com as leveduras de centrifugações anteriores, sempre da centrifugação de maior velocidade para a de menor velocidade, caso seja necessário adequar a concentração celular. Vale salientar que as leveduras mais velhas e floculadas são em sua maioria retiradas na primeira centrifugação.

Conforme um aspecto inovador do presente processo, o novo ciclo fermentativo é iniciado com muito mais vigor, uma vez que estas leveduras são células mais jovens e com maior atividade fermentativa do que as atualmente utilizadas.

O aproveitamento das leveduras presentes no vinho centrifugado causa um aumento do excedente de leveduras “aproveitáveis” geradas

no processo de fermentação, o que acarreta no incremento da quantidade de levedura “sangrada” do processo.

Este volume adicional pode ser enviado para secagem e vendido como matéria prima para diferentes segmentos industriais. Esta já é uma  
5 prática rotineira e lucrativa nas usinas de etanol, e o incremento de volume de creme de leveduras sangrado do processo de fermentação permite que esta fonte de renda torne-se ainda mais importante.

Experimentalmente, os primeiros ensaios mostram a presença de um número elevado de leveduras no vinho após a centrifugação utilizada  
10 no procedimento atualmente empregado (aproximadamente 25% do total de células (vide Figuras 6 A-C e centrifugação 1, Figura 5A, B e C) com uma viabilidade de aproximadamente 90%.

Ao exame microscópico essas leveduras apresentam-se menores e com um alto grau de brotamento, vide Figura 6B, evidenciando que  
15 estão em multiplicação, ao contrário das leveduras provindas da primeira centrifugação, vide Figura 6A, que se apresentam com a parede mais espessa e com uma viabilidade de aproximadamente 70%.

### EXEMPLOS

Para testar a eficiência do processo proposto em (i) segregar  
20 células mais jovens e conseqüentemente com um maior potencial fermentativo e (ii) separar células floculantes de não floculantes, foram conduzidos experimentos utilizando leveduras floculantes e leveduras não floculantes tanto separadamente como juntas, utilizando a situação atualmente empregada para a produção de etanol, ou seja após a  
25 fermentação as células foram centrifugadas a 3000 rpm (controle) e utilizando o processo de separação e seleção de leveduras por centrifugação serial proposto na invenção.

Para a obtenção dos dados experimentais, leveduras floculantes e não floculantes foram crescidas independentemente a 30°C por

aproximadamente 12 horas e isoladas através do processo atualmente empregado e do processo da invenção, tanto separadamente quanto misturadas na proporção de 1:1 (p/p).

### **EXEMPLOS DE CONTROLE**

5 Na condição controle em que somente uma centrifugação é efetuada a 3000 rpm, o perfil é parecido seja a linhagem floculante ou não floculante. Nestes testes cerca de 25% das leveduras ficam no sobrenadante após a centrifugação.

10 O Exemplo de Controle do Exemplo 1 diz respeito a leveduras floculantes.

O Exemplo de Controle do Exemplo 2 diz respeito a leveduras não floculantes.

O Exemplo de Controle do Exemplo 3 diz respeito à mistura 50:50 de leveduras floculantes e não floculantes.

15 As Tabelas 1, 2 e 3 a seguir listam os resultados obtidos para as centrifugações controle e as centrifugações seriais conforme a invenção.

Como já mencionado acima no presente relatório, as leveduras que constituem o sobrenadante são em sua maioria leveduras mais jovens e que acabam sendo desperdiçadas.

20 Note-se que na centrifugação seriada conforme a invenção, o sobrenadante da centrifugação de menor velocidade é re-centrifugado e por isso a soma das porcentagens encontradas em 3 e 4 nos gráficos de barra das Figuras 5A, 5B e 5C referem-se a valores inferiores a 100%, ou seja o total de células refere-se ao total do sobrenadante da  
25 centrifugação anterior.

As Figuras 6A e 6B são micrografias do aspecto das leveduras precipitadas e sobrenadantes respectivamente após centrifugação de 3000 rpm para uma mistura 50:50 para leveduras floculantes e não floculantes. Como pode ser observado, as leveduras presentes no



sobrenadante são menores e em franco processo de brotamento, sendo portanto mais jovens.

### EXEMPLOS

Os Exemplos conforme o presente processo envolvem 5 centrifugações seriadas a 400, 1000 e 4000 rpm, para leveduras floculantes (Exemplo 1), não floculantes (Exemplo 2), e mistura 50:50 de ambas (Exemplo 3).

As leveduras floculantes e não floculantes foram crescidas independentemente a 30°C por aproximadamente 12 horas e isoladas 10 através do processo da invenção.

Conforme a Tabela 1, relativa ao Exemplo 1, o perfil observado para as leveduras floculantes mostra 41% das células que precipitam na primeira centrifugação de 400 rpm.

**TABELA 1**

LEVEDURAS FLOCULANTES (% DE CÉLULAS)		
	PRECIPITADAS	SOBRENADANTES
CONTROLE	76	24
400 rpm	41	59
1000 rpm	45	14
4000 rpm	10	3

15

A Tabela 2, relativa ao Exemplo 2, mostra que apenas 20% precipitam quando são utilizadas células não floculadas na mesma velocidade de centrifugação utilizada para as leveduras floculantes.

20

**TABELA 2**

LEVEDURAS NÃO FLOCULANTES (% DE CÉLULAS)		
	PRECIPITADAS	SOBRENADANTES
CONTROLE	73	27
400 rpm	20	80
1000 rpm	37	43
4000 rpm	36	7

Já para a centrifugação serial da mistura em partes iguais de leveduras floculantes e não floculantes, relativa ao Exemplo 3, Tabela 3, observa-se uma precipitação de 40% de células na primeira centrifugação (400 rpm) com predomínio de células floculantes.

Dos 60% de células restantes, 30% sedimentam na segunda centrifugação (1000 rpm), sendo novamente em sua maioria células floculantes (Figura 6E), restando 30% de células do total para a próxima centrifugação.

**TABELA 3**

LEVEDURAS FLOCULANTES E NÃO FLOCULANTES 50:50 (% DE CÉLULAS)		
	PRECIPITADAS	SOBRENADANTES
CONTROLE	74	26
400 rpm	40	60
1000 rpm	30	30
4000 rpm	28	2

Os sobrenadantes re-centrifugados a 1000 rpm mostram o seguinte resultado:

- a. Células floculantes (Tabela 1)- Dos 59% de células restantes - 45% sedimentam nesta velocidade, restando apenas 14% de células do total para a próxima centrifugação;
- 5 b. Células não floculantes (Tabela 2)- Dos 80% de células sobrenadantes, 37% sedimentam nesta velocidade, restando 43% de células do total para a próxima centrifugação. Estas células são as células jovens que serão reaproveitadas no processo. Isso significa que mesmo que leveduras floculantes contaminem o processo elas sedimentariam nos
- 10 primeiros passos de centrifugação. Portanto o processo proposto é útil como um método de limpeza de linhagens indesejáveis no processo fermentativo

Vale salientar que essas células restantes são essencialmente células não floculantes e mais jovens, mostrando que o processo de centrifugação seriada proposto, além de segregar (separar) as células

15 por tamanho, segregando as mais jovens para recirculação, também é capaz de limpar (selecionar somente as células não floculantes) as células floculantes e indesejáveis para o processo (Figuras 6F e 6G).

Em relação à análise das leveduras isoladas através do processo de centrifugação seriada tal como apresentado nas Tabelas 1, 2 e 3, Figura 5A, B e C e Figura 6 C a 6G, as leveduras foram testadas independentemente e misturadas em igual proporção após crescimento.

As leveduras foram centrifugadas a 400, 1000 e 4000 rpm consecutivamente. Para cada uma das fases – precipitado e

25 sobrenadante – as células foram observadas em microscópio para avaliação da morfologia, bem como avaliadas quanto à quantidade de células presentes – vide gráficos de barras das Figuras 5A, 5B e 5C.

As leveduras floculantes mostram uma capacidade maior de precipitação em velocidades inferiores (400 e 1000 rpm) quando testadas

independentemente e também em conjunto com células não floculantes, vide Tabela 1 e 3 e Figura 6A, 6C, 6D e 6E.

Em relação às células não floculantes, as células precipitadas nas primeiras centrifugações apresentam morfologias diferentes entre as células das primeiras centrifugações e nas posteriores. Assim, nas primeiras centrifugações as leveduras precipitadas são maiores e com pouco brotamento enquanto as sobrenadantes estão isoladas, menores e com um brotamento significativo, evidenciando que estas células estão em franco processo de proliferação. Como exemplo, em uma centrifugação a 400 rpm a Figura 7A mostra a micrografia das leveduras precipitadas, de tamanho maior e a Figura 7B, a micrografia das leveduras sobrenadantes, menores e com brotamento significativo.

Quando as leveduras floculantes e não floculantes são misturadas em iguais proporções, demonstram, quando observadas ao microscópio, uma alta precipitação de células floculantes em velocidades menores, vide Figura 6C e 6E. Esses resultados evidenciam a potencialidade do processo de centrifugação em série em separar células com potencial fermentativo superior (menores e em brotamento) e não floculantes.

O presente processo permite a segregação de população de leveduras por idade e atividade celular.

O presente processo permite igualmente limpar as células floculantes do processo.

A população de leveduras oriundas das centrifugações adicionais logo após a primeira centrifugação, por apresentar tamanho e peso menor, será mais jovem, apresentando maior atividade fermentativa.

A população de leveduras oriunda da primeira centrifugação é mais pesada, por ser mais velha ou agregada pelo processo de floculação, e com menor atividade fermentativa.

O processo de centrifugação do caldo fermentado com a disposição de centrífugas em série e anterior ao processo de destilação permite a recuperação de uma quantidade maior de leveduras em relação ao processo atual, com benefícios diretos sobre a qualidade da vinhaça, que terá índices reduzidos de DBO por conter leveduras em número reduzido, podendo até mesmo estar ausentes em processos que usem centrifugações mais elevadas.

As técnicas atuais não permitem essa segregação de leveduras por atuarem com a centrifugação em uma única velocidade.

As técnicas atuais permitem que uma quantidade importante de levedura se perca no vinho e pela destilação deste, na vinhaça, agravando a nocividade da vinhaça sobre o meio ambiente.

Vantajosamente, a presente invenção permite que o leite de levedura ao ser retornado ao processo de fermentação seja composto por uma população previamente selecionada, mais jovem, e de maior capacidade fermentativa, traduzido em melhores índices de produtividade fermentativa.

Além disso, no caso de leveduras floculadas que de alguma forma estejam presentes no processo fermentativo, o processo do presente invento promove a remoção dessas leveduras durante as centrifugações de baixa velocidade, contribuindo para que essas leveduras não proliferem durante o processo, afetando a rendimento fermentativo. De fato como evidenciado na Tabela 3, quase que a totalidade de células floculadas seriam eliminadas nas primeiras centrifugações.

Adicionalmente o presente processo proporciona um incremento na possibilidade de sangria/secagem de leveduras, ampliando de modo significativo em relação aos processos do estado da técnica as possibilidades de aproveitamento comercial da levedura excedente gerada durante o processo de fermentação.

A levedura “sangrada” (descartada) do processo de fermentação será prioritariamente oriunda da primeira centrifugação, ou seja, composta pela população de leveduras mais velhas e com menor atividade fermentativa e/ou flocculadas.

## REIVINDICAÇÕES

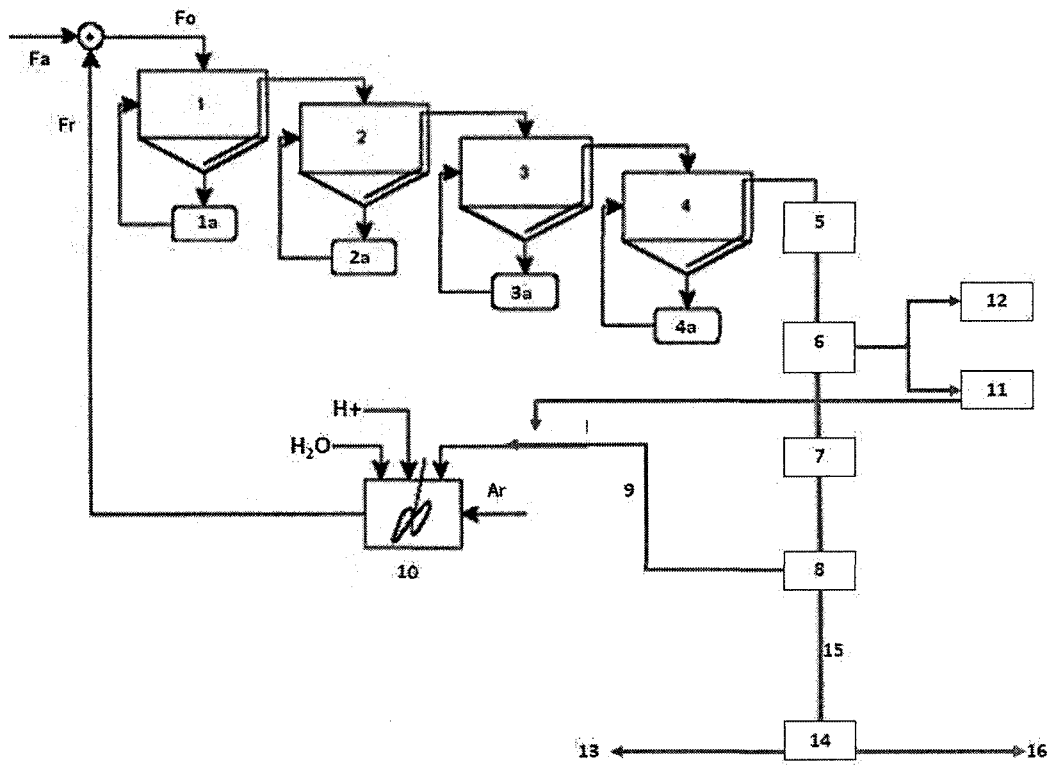
1. Processo de separação e seleção de leveduras para fermentação alcoólica a partir de uma carga de sacarose fermentada com auxílio de leveduras, dito processo sendo caracterizado por compreender as etapas de:
- 5
- a) após a primeira centrifugação **(6)**, separar e armazenar em tanques **(11, 12)**, as leveduras mais velhas e floculadas para secagem, obtendo um vinho;
- b) enviar via a linha **(L13)** o vinho da etapa a) para um Tanque pulmão **(13)**;
- 10
- c) a partir do Tanque **(13)** dirigir o vinho via **(L14)** para o processo de centrifugações em série **(14)**, com pelo menos duas centrifugações de rotações crescentes de pelo menos 400 rpm até 5000 rpm onde o sobrenadante de cada centrifugação se torna a carga da centrifugação seguinte e o precipitado é coletado, obtendo leveduras jovens separadas e selecionadas e produtos de fermentação;
- 15
- d) dirigir via **(L15)** ditas leveduras jovens e de alta capacidade fermentativa da etapa c) para o tanque de tratamento **(10)** para diluição com água e tratamento ácido convencionais;
- 20
- e) retornar via **(L19)** as ditas leveduras diluídas e tratadas da etapa d) para os tanques de fermentação **(Fr)**;
- f) separar, por destilação, os produtos de fermentação em vinho **(15)**, álcool industrial **(16)** e vinhaça **(17)** com teor de material orgânico inferior ao teor da vinhaça resultante de processos de produção de etanol industrial do estado da
- 25
- técnica que utilizam uma única centrifugação; e

g) secar adicionalmente leveduras no tanque **(13)** e embalar o excedente da levedura proveniente das diversas centrifugações.

- 5 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa c) as centrifugações ocorrerem entre 400 e 4000 rpm.
3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por na etapa c) a centrifugação ocorrer a 1000 rpm.
- 10 4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a concentração celular de leveduras ser mantida pela adição de leveduras provindas de várias centrifugações, sob a condição de a dita adição ser efetuada com leveduras obtidas a partir da centrifugação de maior velocidade para a de menor velocidade.
- 15 5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por separar células floculantes de células não floculantes.
6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por reduzir a proporção de células floculantes indesejáveis em relação a processos análogos do estado da técnica utilizando uma única centrifugação.
- 20 7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o excedente de leveduras aproveitáveis geradas no processo de fermentação ser superior ao de processos análogos do estado da técnica utilizando uma única centrifugação.



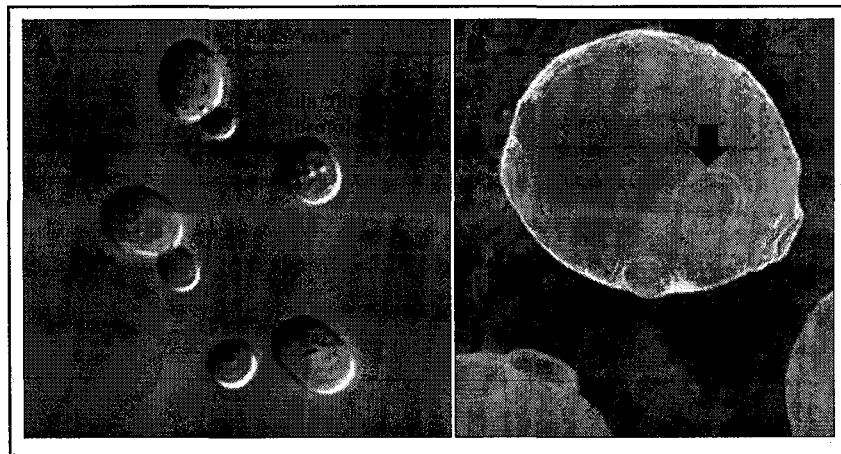
FIG. 1



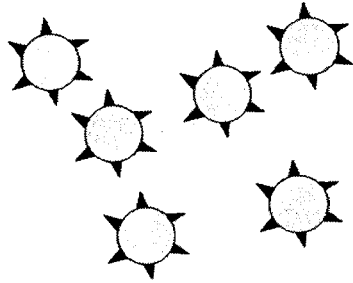
ESTADO DA TÉCNICA

FIG. 2A

FIG. 2B



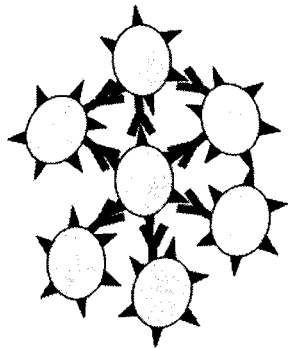
**FIG. 3A**



▲ lectinas

Y Floculinas

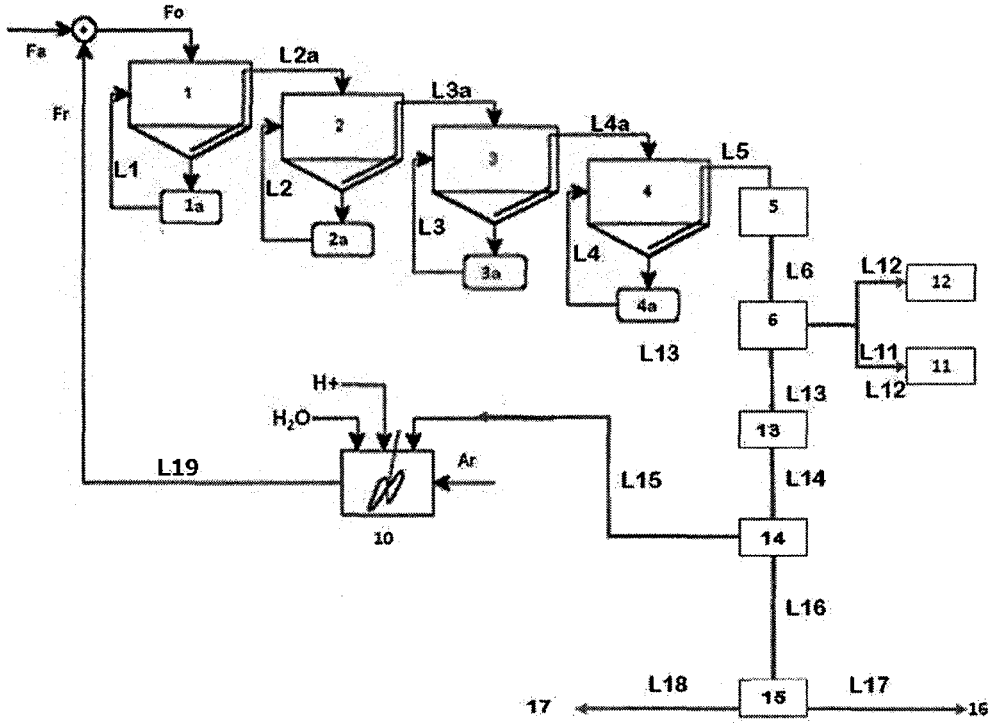
**FIG. 3B**



▲ lectinas

Y Floculinas

FIG. 4



INVENÇÃO

FIG. 5A

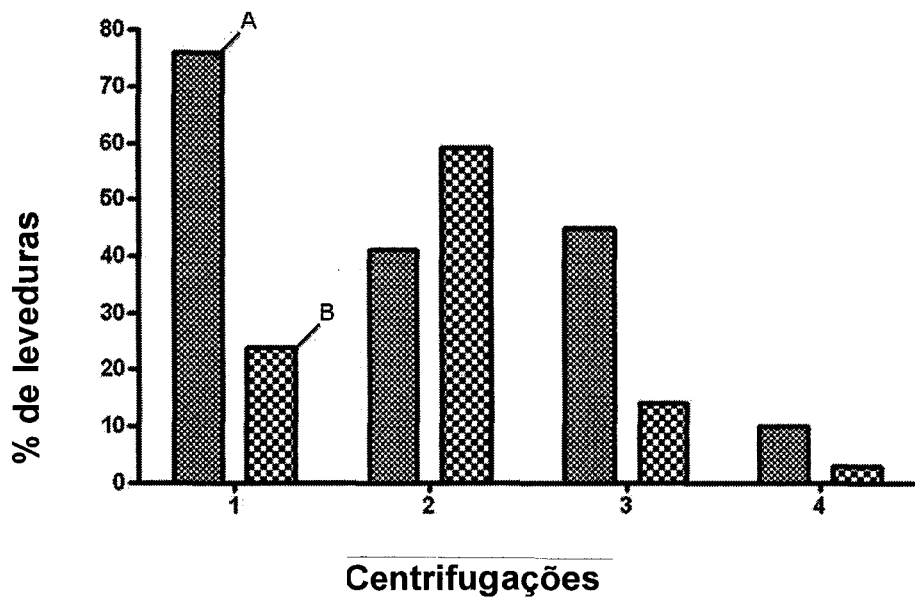


FIG. 5B

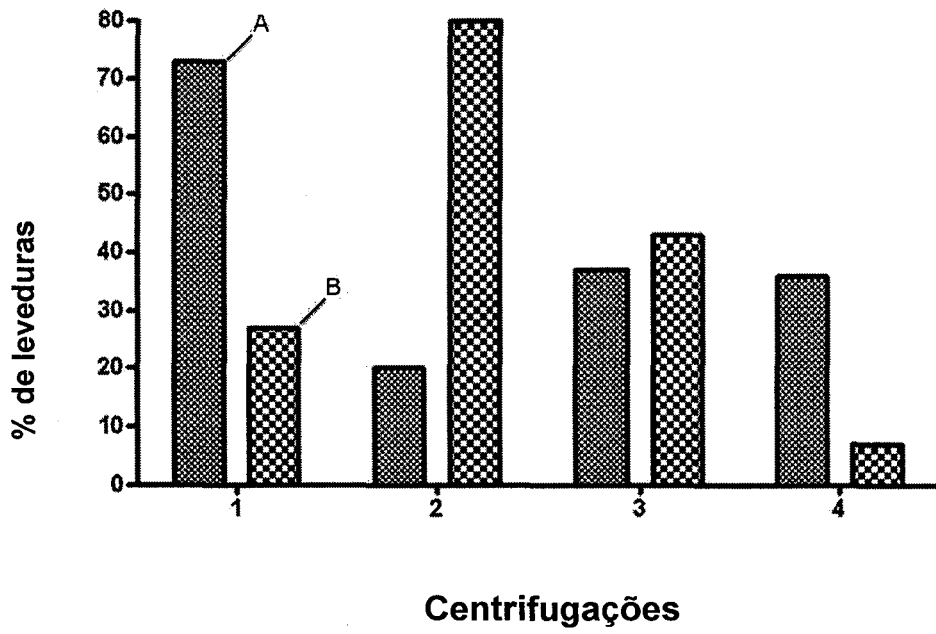
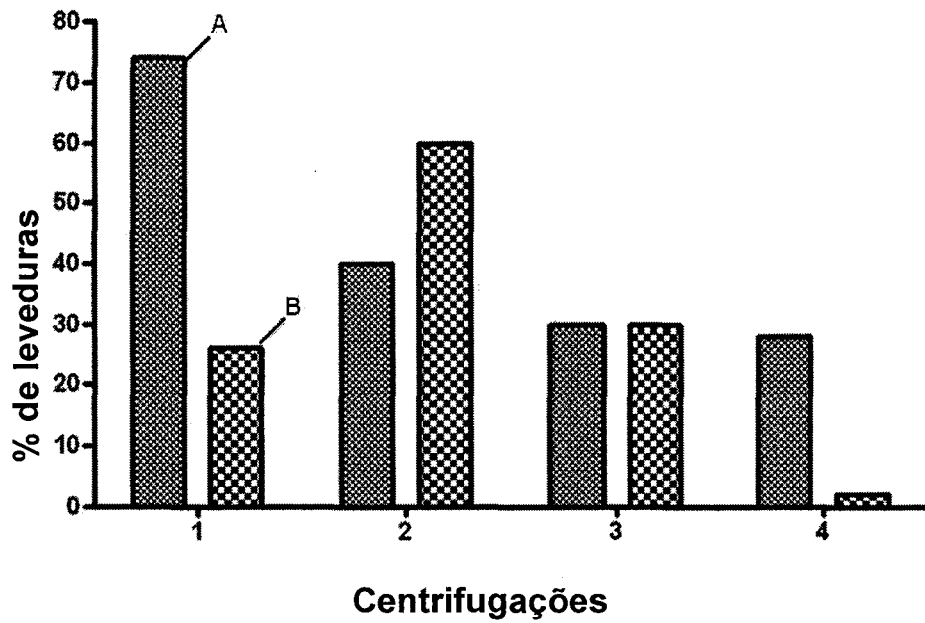
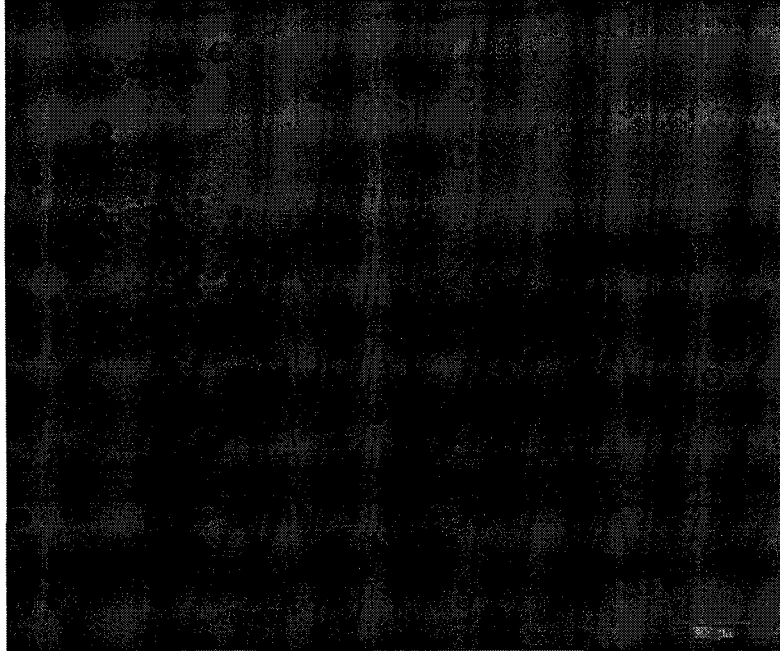


FIG. 5C

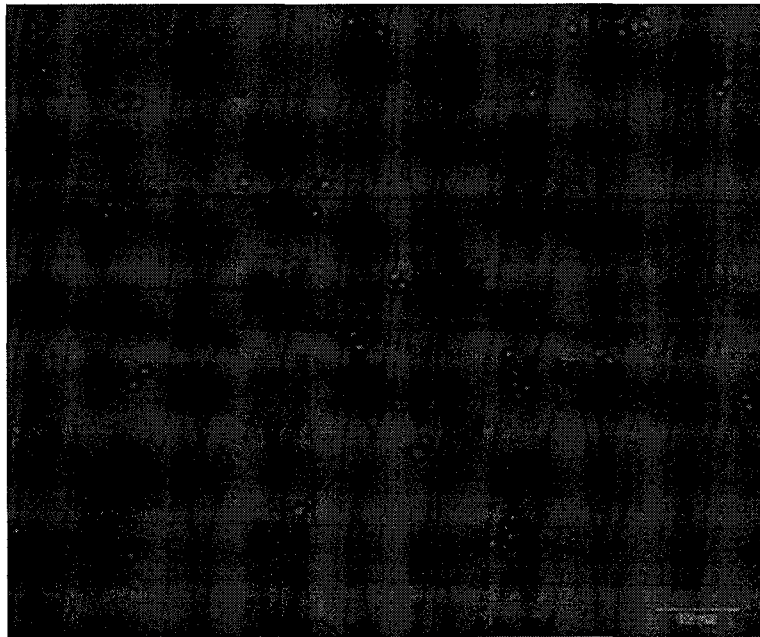


**FIG. 6A**



**CONTROLE**

**FIG. 6B**



**CONTROLE**

FIG. 6C

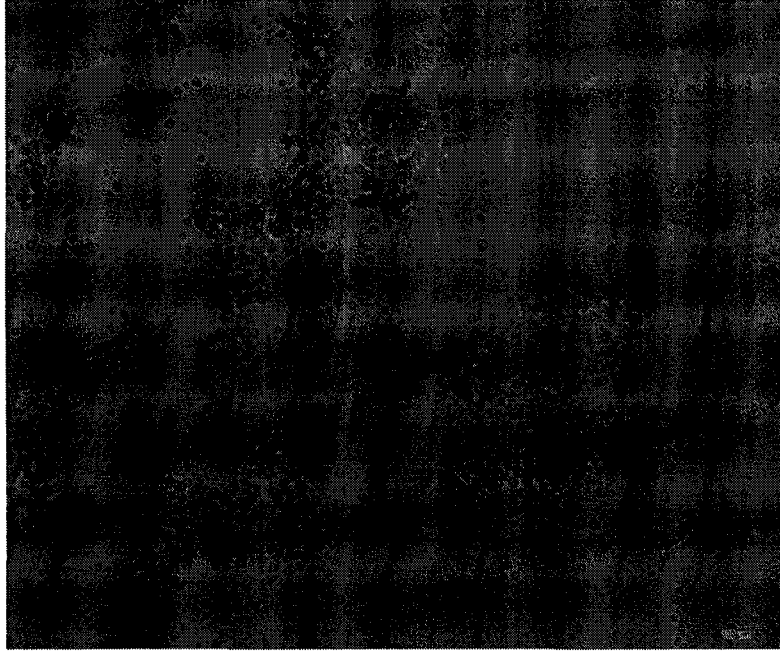


FIG. 6D

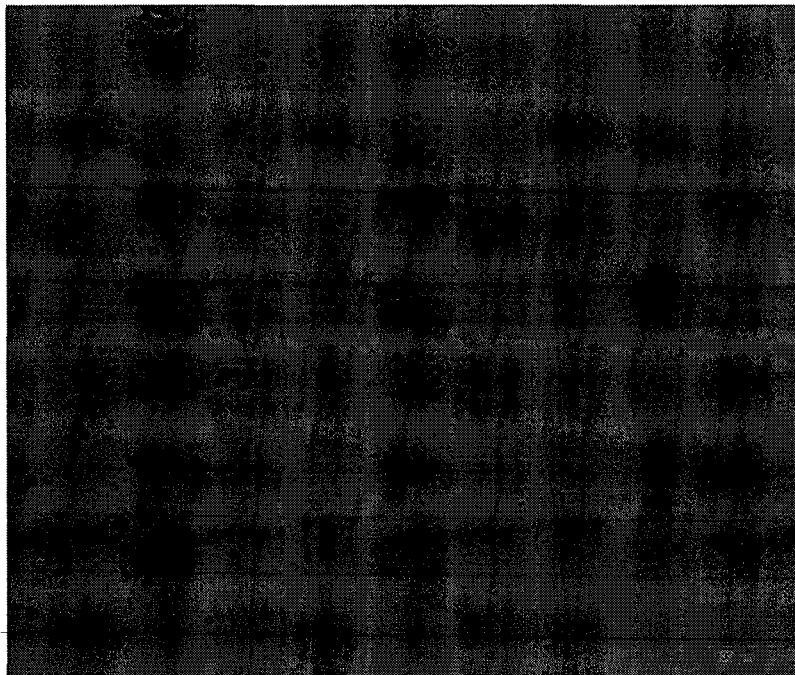


FIG. 6E

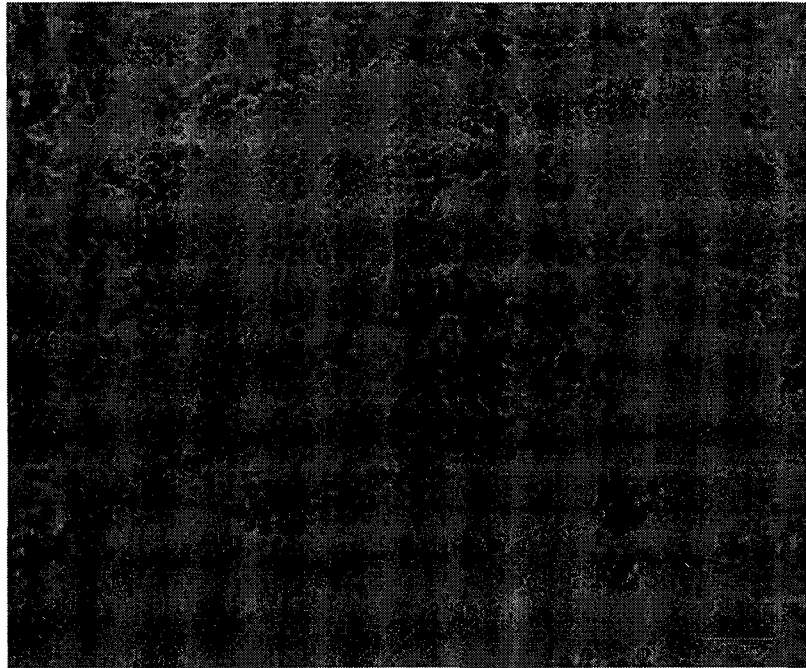


FIG. 6F

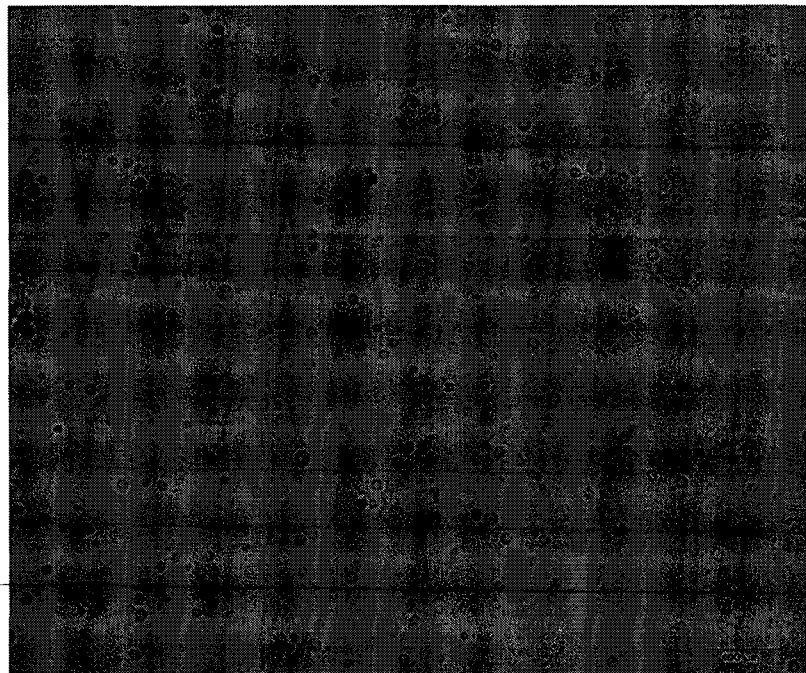


FIG. 6G

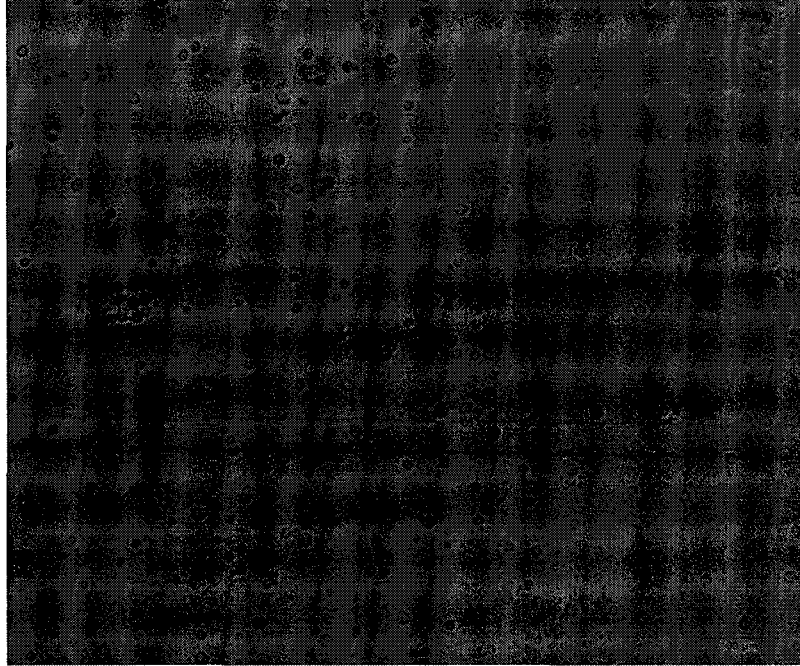
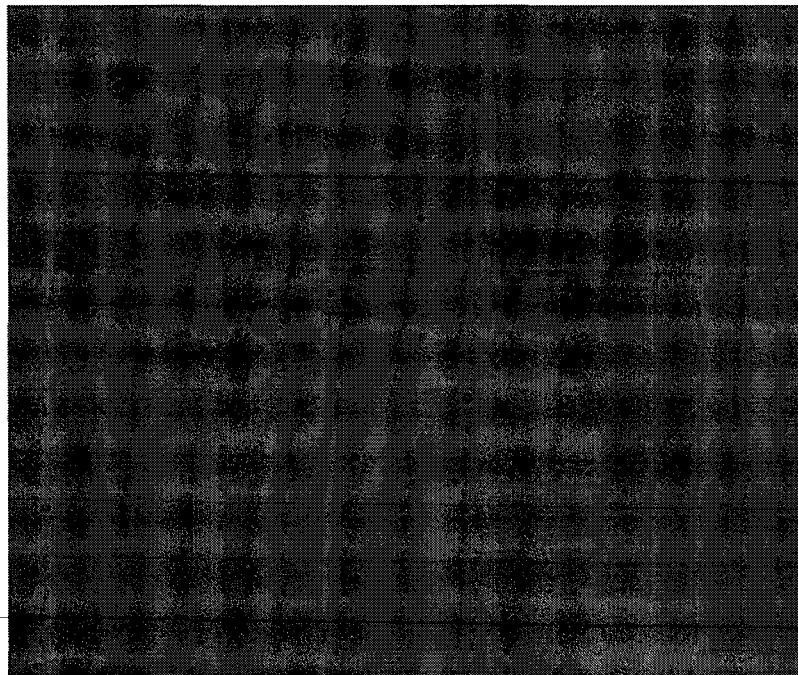
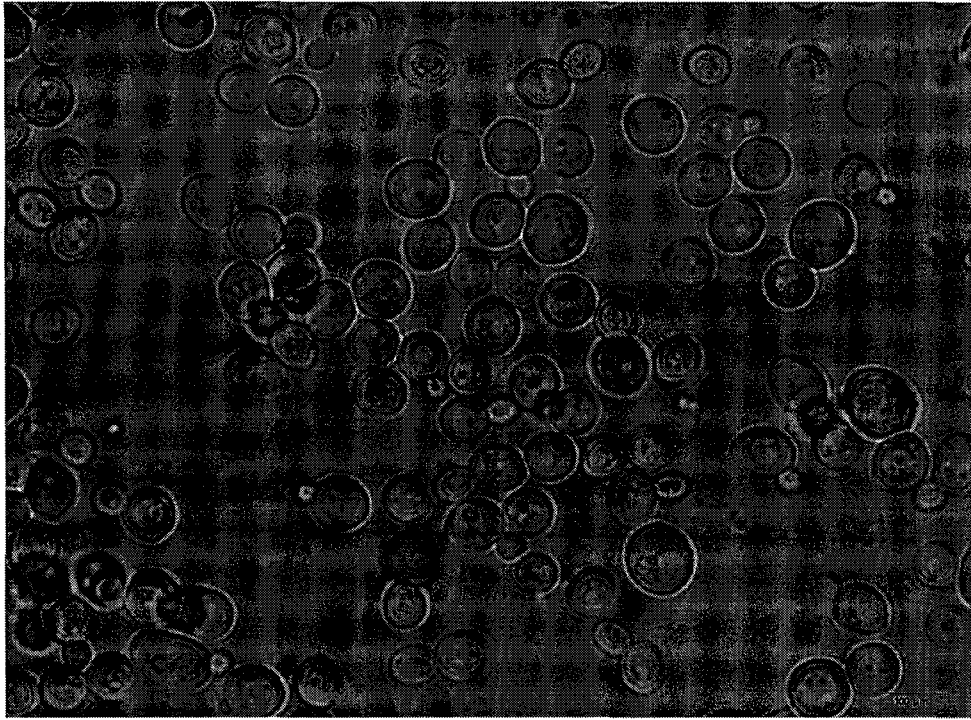


FIG. 6H

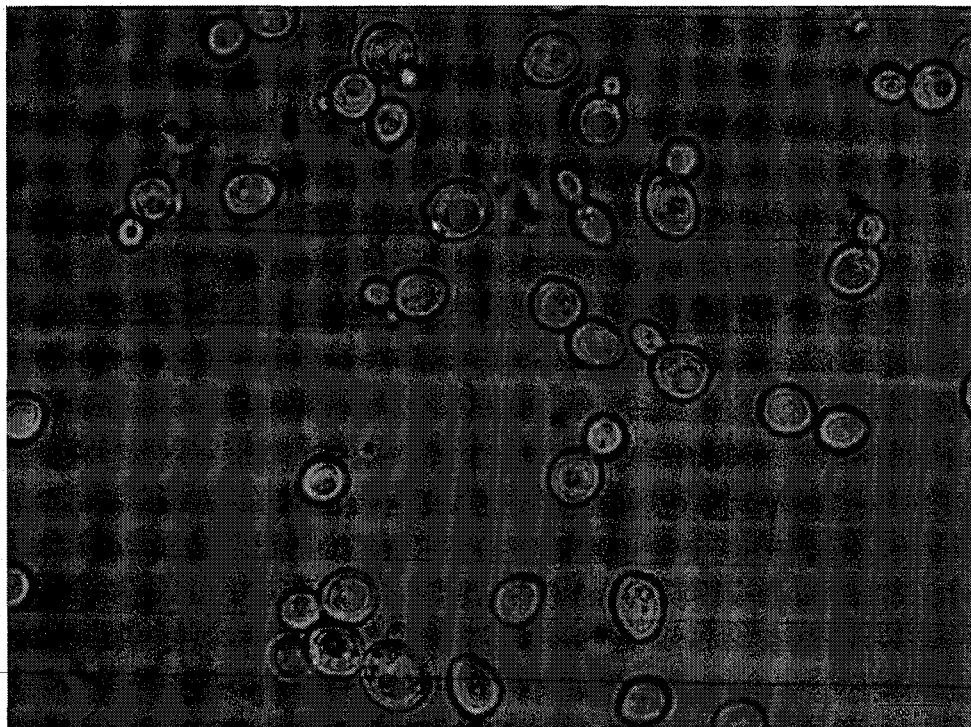




**FIG. 7A**



**FIG. 7B**



**RESUMO**  
**PROCESSO DE SEPARAÇÃO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA**  
**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

É descrito um processo de separação e seleção de leveduras para  
5 fermentação alcoólica que compreende, após a primeira centrifugação em  
(6), enviar o vinho separado para um tanque pulmão (13) e daí via L14 para  
o processo (14) de centrifugações em série com pelo menos duas  
centrifugações crescentes de pelo menos 400 rpm até 5000 rpm onde o  
sobrenadante de cada centrifugação se torna a carga da centrifugação  
10 seguinte e o precipitado é coletado, obtendo leveduras jovens separadas e  
selecionadas e produtos de fermentação, as leveduras jovens sendo  
retornadas após diluição com água e tratamentos convencionais para os  
tanques de fermentação (Fr). Após destilação, a vinhaça (17) separada  
apresenta teor de material orgânico inferior ao teor da vinhaça resultante de  
15 processos de produção de etanol industrial do estado da técnica que  
utilizam uma única centrifugação.