



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

(21) PI 0715244-2 A2



* B R P I 0 7 1 5 2 4 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 28/09/2007
(43) Data da Publicação: 11/06/2013
(RPI 2214)

(51) Int.Cl.:
A01N 59/08
C12P 7/06

(54) Título: PROCESSO PARA EVITAR SUBSTANCIALMENTE O CRESCIMENTO DE BACTÉRIA

(30) Prioridade Unionista: 19/06/2006 US 60/814957

(73) Titular(es): E.I DU PONT DE MOURS AND COMPANY

(72) Inventor(es): DERRICK OKULL, DWAYNE DISHCERT, ERIC GUY SUMMER

(74) Procurador(es): Carolina Nakata

(86) Pedido Internacional: PCT US2007014299 de 28/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/149450 de 27/12/2007

(57) Resumo: PROCESSO PARA EVITAR SUBSTANCIALMENTE O CRESCIMENTO DE BACTÉRIA EM UM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO. A presente invenção se refere a um processo de fermentação para a produção de etanol a partir de fontes naturais, tais como milho, que compreende a introdução de um açúcar fermentável, um inoculante e um dióxido de cloro estabilizado em um sistema de fermentação. O dióxido de cloro estabilizado em um sistema de fermentação. O dióxido de cloro estabilizado é adicionado preventivamente ao sistema de fermentação em concentrações no sistema de fermentação de ácido acético não superiores a 0,30% (peso/ volume) e de ácido láctico não superiores a 0,60% (peso/volume). O dióxido de cloro estabilizado é adicionado em uma quantidade efetiva para prevenir substancialmente o crescimento de bactéria.

“PROCESSO PARA EVITAR SUBSTANCIALMENTE O CRESCIMENTO DE BACTÉRIA EM UM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um processo de fermentação para produzir etanol, especificamente, um processo em que a infecção bacteriana é substancialmente prevenida.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Ao passo que as reservas de petróleo se esgotam e se tornam mais caras, a necessidade por fontes de energia alternativas e, de preferência, sustentáveis aumenta. Por alguns anos, o etanol foi considerado e foi utilizado como uma opção para a substituição parcial ou completa dos combustíveis com base em petróleo para diferentes aplicações. Os automóveis movidos a etanol são uma realidade. O etanol possui vantagens com relação à utilização de gasolina convencional como uma fonte de combustível renovável.

O etanol é um produto químico principal que foi produzido por humanos por milênios a partir de fontes naturais. O etanol atual é produzido em larga escala a partir de fontes naturais por um processo de fermentação em que o açúcar é convertido a etanol e dióxido de carbono por levedura. Muitas matérias primas podem ser utilizadas para fornecer o açúcar por fermentação. As fontes naturais atuais incluem o milho, sorgo (*milo*), trigo, cevada, painço, palha, sorgo, cana de açúcar, açúcar de beterraba, melão, soro do leite e batatas. De fato, qualquer amido ou material celulósico que inclui quase todos os vegetais, pode ser utilizado como uma fonte de açúcar para a utilização na produção de etanol, assim como o amido ou a celulose podem ser precursores do açúcar.

Uma preocupação importante com os sistemas de fermentação convencionais é a dificuldade na prevenção da contaminação microbiana, especialmente a infecção bacteriana. Infelizmente, a atmosfera ótima para a

fermentação também é extremamente propícia para o crescimento bacteriano. A bactéria pode converter o açúcar (glicose) em ácidos orgânicos, tal como o ácido acético e o ácido láctico, ao invés de etanol. Além disso, a bactéria cresce rapidamente no ambiente rico em nutriente para um sistema de fermentação e pode consumir açúcar (glicose) mais rápido do que a levedura. Além disso, os ácidos orgânicos produzidos pela bactéria inibem o desempenho e o crescimento da levedura. Deste modo, a infecção bacteriana resulta em menor rendimento na produção do etanol e o processo de fermentação se torna menos econômico.

10 As atuais estratégias da indústria para combater a infecção bacteriana nos sistemas de fermentação incluem o monitoramento quanto à presença de ácidos orgânicos (por exemplo, ácido acético e ácido láctico) seguido pelo tratamento corretivo. Isto é, uma vez que os ácidos são detectados, os antibióticos ou biocidas podem ser adicionados para controlar o crescimento bacteriano. Entretanto, o crescimento bacteriano e a infecção são um problema recorrente. Qualquer alimentação em um sistema de fermentação, tal como a água, massa, enzimas e leveduras, bem como o próprio recipiente de fermentação (se não desinfectado entre as bateladas) pode ser uma fonte de bactéria. Portanto, o monitoramento freqüente é necessário e introduções repetidas de antibióticos podem ser requeridas.

25 A utilização de antibióticos para reduzir o crescimento bacteriano em um sistema de fermentação se tornou uma desvantagem. Certos antibióticos permanecem e se acumulam nos produtos sólidos de fermentação, se eles não forem desativados na reação com a bactéria alvo. Os produtos sólidos incluem os sólidos de grão seco do destilador (DDGS) e os sólidos de grão úmido do destilador (DWGS). Os DDGS e DWGS são subprodutos valiosos da fermentação e são utilizados nas rações animais. Em muitos países, a quantidade de antibióticos na ração animal está sob controle

regulamentar ou está sendo considerada para o mesmo.

Em geral, os biocidas desempenham de modo muito ruim nos sistemas de fermentação porque eles não são específicos e também podem atacar as leveduras. O dióxido de cloro estabilizado (SCD) é um biocida que foi utilizado nos sistemas de fermentação para tratar a infecção bacteriana. Embora as leveduras pareçam não ser afetadas, este tratamento é corretivo, isto é, apenas após o sistema ter se tornado infectado. As adições repetidas também podem ser requeridas conforme indicado acima.

A patente US 4.929.365 descreve um processo de tratamento corretivo para remover os microorganismos e o biofilme produzido por tais microorganismos, que passam então a residir no biofilme, a partir de um substrato submerso em um ambiente aquoso. O processo utiliza o dióxido de cloro estabilizado (SCD), que é introduzido no substrato e então deixado penetrar através do biofilme protetor e na camada de microorganismo. Uma fonte de nutriente é necessária para criar um ambiente ácido dentro do biofilme. Este ambiente ácido ativa o SCD, que então mata e destrói o microorganismo e o biofilme do substrato submerso.

Uma alternativa para o tratamento corretivo é evitar o crescimento da bactéria. A adição de antibióticos em quantidades para evitar o crescimento de bactéria foi utilizada. Entretanto, a questão do acúmulo de antibióticos nos sólidos da fermentação continua. O desenvolvimento da resistência bacteriana também é uma consequência bem conhecida da utilização de antibióticos.

Portanto, há uma necessidade em evitar o crescimento bacteriano em um processo de fermentação, enquanto minimiza ou elimina a utilização de antibióticos. A presente invenção satisfaz esta necessidade.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção apresenta um processo para evitar substancialmente o crescimento de bactéria em um sistema de fermentação

que compreende a introdução de um açúcar fermentável, um inoculante e um dióxido de cloro estabilizado em um sistema de fermentação, em que o inoculante converte o açúcar em etanol e dióxido de carbono; e em que o dióxido de cloro estabilizado é adicionado, em uma quantidade eficaz para evitar substancialmente o crescimento de bactéria, a um ou mais açúcares fermentáveis, ao inoculante ou ao sistema de fermentação com concentrações no sistema de fermentação de ácido acético não superiores a 0,30% (peso/volume) e ácido láctico não superiores a 0,60% (peso/volume). O dióxido de cloro estabilizado compreende pelo menos um de um complexo de oxi-cloro contendo dióxido de cloro, um componente contendo clorito ou uma entidade capaz de formar dióxido de cloro em um meio líquido quando exposto ao ácido. A quantidade de dióxido de cloro estabilizado adicionado é de 0,0001 a cerca de 5%, com base no peso do dióxido de cloro ativado que pode ser produzido e o peso total do sistema de fermentação.

O dióxido de cloro estabilizado pode ser adicionado a um ou mais do açúcar fermentável, inoculante ou sistema de fermentação, em uma quantidade eficaz para prevenir substancialmente o crescimento de bactéria e, portanto, a formação de ácidos orgânicos no sistema. De preferência, o dióxido de cloro estabilizado é adicionado no sistema de fermentação antes da adição do açúcar fermentável ou antes da adição do inoculante no sistema de fermentação, de maior preferência, antes da adição do inoculante.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra a densidade óptica das células bacterianas suspensas no meio de crescimento líquido; o dióxido de cloro estabilizado foi adicionado no meio de crescimento contendo as células em concentrações crescentes e a densidade óptica foi monitorada por um período de 22 horas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a uma produção industrial de

etanol por meio de fermentação. O seguinte é uma descrição de como este processo pode ser realizado utilizando o milho como matéria-prima. Será entendido pelos técnicos no assunto que este processo pode ser variado, por exemplo, pela utilização de outras matérias-primas.

5 O etanol pode ser produzido a partir do milho ou outro grão em um processo por moinho úmido ou moinho seco conforme é conhecido pelos técnicos no assunto no estado da técnica. Em um processo de moinho a úmido, o milho é saturado ou impregnado e então separado em componentes. Em um processo de moinho seco, o milho é moído em farinha de milho e
10 processado sem separação. O componente do amido de milho a partir do processo do moinho úmido ou da farinha de milho do processo do moinho seco é misturado com água e enzimas e cozido para solubilizar o amido.

O amido de milho é um polissacarídeo, isto é, um polímero fabricado de unidades individuais de glicose. O amido é convertido em
15 polissacarídeos menores (mais reduzido), isto é, dextrinas, por enzimas (α -amilases). Os polissacarídeos menores são convertidos em um açúcar fermentável, isto é, glicose (monossacarídeo), utilizando a enzima glicoamilase.

O processo para a produção de etanol compreende então a fermentação do açúcar em um reator em batelada ou contínuo pelo contato do
20 açúcar com um inoculante, tal como a levedura, em um sistema de fermentação, para produzir um produto da fermentação compreendendo o etanol e o dióxido de carbono. As etapas subseqüentes incluem a destilação do produto de fermentação para remover cerca de 95% do líquido, bem como os sólidos e produzem um etanol destilado compreendendo cerca de 5% de água;
25 e desidratando o etanol destilado, produzindo deste modo 100% (200 *proof*) de etanol. As etapas adicionais compreendem a desnaturação do etanol seco pela mistura em cerca de 2 a 5% de gasolina ou outro aditivo para utilizações não em bebidas; e recuperação do dióxido de carbono e sólidos co-produzidos. As

etapas adicionais na produção da bebida de etanol podem incluir o envelhecimento, a mistura e o engarrafamento, tal como aquele descrito no pedido de patente US 2006/0159812 A1. Tais etapas adicionais também são descritas em *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Beverage Spirits, Distilled* por John E. Bujake, John Wiley & Sons, Inc. (New York), 2001. Estas etapas são conhecidas pelos técnicos no assunto.

Os processos para a produção de etanol são realizados em condições que não impedem a introdução de bactéria nos sistemas de fermentação. As fontes de bactéria em um sistema de fermentação podem incluir quaisquer das alimentações (açúcar fermentável, inoculante) introduzidas no sistema. A limpeza inadequada dos sistemas de fermentação entre as bateladas ou operações também pode ser uma fonte de bactéria para as fermentações subseqüentes. As infecções bacterianas dos sistemas de fermentação produzem subprodutos de ácidos orgânicos a partir do açúcar fermentável, particularmente o ácido acético e o ácido láctico. Portanto, a bactéria consome os ingredientes (açúcar fermentável) e inibe a atividade do inoculante. O ácido acético e o ácido láctico também são produzidos pela levedura durante a fermentação, mas em quantidades não suficientes para interferir significativamente com o rendimento geral e a eficiência do processo, conforme descrito no presente. As concentrações crescentes dos ácidos orgânicos indicam o crescimento da infecção bacteriana em um sistema de fermentação.

No processo da presente invenção, o dióxido de cloro estabilizado (SCD) é adicionado em um ou mais do açúcar fermentável, inoculante ou sistema de fermentação, em uma quantidade eficaz para evitar substancialmente o crescimento da bactéria e, portanto, a formação de ácidos orgânicos no sistema. Isto é, o SCD é adicionado antes do crescimento substancial da bactéria no sistema, tal como antes da introdução de qualquer

ou todos os ingredientes necessários para iniciar o processo de fermentação, ou pode ser determinado pelas concentrações de ácido acético e ácido láctico no sistema. As bactérias são, portanto, substancialmente impedidas de crescerem no sistema de fermentação na presença do SCD. De modo
5 surpreendente, o SCD permanece no sistema de fermentação e as bactérias são substancialmente impedidas de crescerem e de contaminarem o produto através da geração *in situ* do dióxido de cloro ativado, isto é, ClO_2 pela reação do SCD com o ácido produzido no sistema.

De modo a impedir substancialmente o crescimento de bactéria e
10 a formação significativa de ácidos orgânicos em um sistema de fermentação, o dióxido de cloro estabilizado é adicionado na concentração de ácido acético não superior a 0,30% (peso/ volume) e na concentração de ácido láctico não superior a 0,60% (peso/ volume). Nas concentrações de ácidos acima destes
15 níveis, há um efeito prejudicial na levedura e perda significativa do rendimento de etanol com base na conversão do açúcar. Portanto, a adição do dióxido de cloro estabilizado acima destes níveis seria corretivo, uma vez que o crescimento bacteriano substancial já ocorreu, conforme indicado pelas concentrações dos ácidos orgânicos.

AÇÚCAR FERMENTÁVEL

20 Um açúcar fermentável apropriado para a utilização na presente invenção pode ser derivado essencialmente de qualquer fonte de planta que compreende o açúcar, amido e/ou a celulose. Isto é, o amido e/ou a celulose podem ser convertidos pelos processos conhecidos no estado da técnica, por exemplo, utilizando as enzimas, para o açúcar apropriado para a utilização
25 como um açúcar fermentável na presente invenção. O açúcar fermentável pode ser derivado de um ou mais de qualquer produto à base de grão, tal como o milho, aparas de madeira, palha de trigo, forragem de milho, *switch grass* (*Panicum virgatum*). O açúcar fermentável pode ser alternativamente derivado

do sorgo (*milo*), cevada, painço, sorgo, cana de açúcar, açúcar de beterraba, melação, soro do leite e batatas. Os processos são conhecidos pelos técnicos no assunto para converter estas fontes em açúcar fermentável. Convenientemente, o açúcar fermentável é derivado do milho, utilizando os
5 processo de moinho úmido ou moinho seco para produzir um amido liquefeito. O amido liquefeito sofre a sacarificação, em que o amido é colocado em contato com enzimas para converter o amido em glicose, formando deste modo o açúcar fermentável.

O termo "massa" é utilizado no presente para se referir a uma
10 composição que compreende um açúcar fermentável. A massa compreende qualquer mistura de grão misturado ou outros carboidratos fermentáveis em água utilizada na produção de etanol em qualquer estágio da mistura do açúcar fermentável em água antes de qualquer cozimento e sacarificação através do término da fermentação, conforme definido em Jacques, K.A., Lyons, T.P.,
15 Kelsall, D.R, *The Alcohol Textbook*, 2003, 426-424, Nottingham University Press, UK.

Em um processo de fermentação, o açúcar está tipicamente presente em um sistema de fermentação em uma concentração de cerca de 5 a cerca de 40% (peso/ volume), de preferência, no intervalo de cerca de 10 a
20 35% (peso/ volume).

INOCULANTE

Para os propósitos do presente, um inoculante é um microorganismo que é capaz de converter um açúcar fermentável em etanol. As leveduras são inoculantes comuns, que são utilizadas na fermentação do
25 etanol. As leveduras são microorganismos capazes de viver e crescer em ambientes aeróbicos (com oxigênio) e não aeróbicos (sem oxigênio).

A seguinte discussão está direcionada a um processo em que o inoculante é uma levedura.

Com relação à bactéria, as leveduras possuem velocidades de fermentação de moderadas a lenta. Para compensar sua velocidade metabólica, grandes quantidades de leveduras podem ser requeridas na produção de etanol industrial em larga escala. Antes da introdução de levedura em um recipiente de fermentação, um inóculo de levedura é produzido em um tanque de propagação separado do recipiente de fermentação. Em um tanque de propagação, uma cultura iniciadora de levedura é fornecida com a composição nutriente, que pode compreender o açúcar fermentável, enzimas e água para ativar ou crescer a levedura. A propagação da levedura também ocorre durante a etapa de fermentação. Entretanto, a ativação da levedura em um tanque de propagação fornece levedura altamente ativa na introdução no recipiente de fermentação.

A levedura inoculante é adicionada no sistema de fermentação em uma quantidade tipicamente de cerca de 1 libra de levedura seca por 1.000 galões (1 Kg por 8.000 litros) da composição que compreende o açúcar fermentável, isto é, a massa. Os tempos de espera típicos para a etapa de fermentação nesta carga de levedura estão entre 40 e 72 horas. Será reconhecido pelos técnicos no assunto que a quantidade de levedura adicionada por variar, junto com os tempos de espera.

DIÓXIDO DE CLORO ESTABILIZADO

O termo "dióxido de cloro estabilizado" conforme utilizado no presente significa um ou mais complexos de oxi-cloro contendo dióxido de cloro e/ou um ou mais componentes contendo clorito e/ou um ou mais de outras entidades capazes de formar o dióxido de cloro em um meio líquido quando exposto ao ácido. Portanto, o dióxido de cloro estabilizado compreende pelo menos um do complexo de oxi-cloro contendo dióxido de cloro, um componente contendo clorito ou uma entidade capaz de formar o dióxido de cloro em um meio líquido quando exposto ao ácido. Na presente invenção, o

dióxido de cloro estabilizado reage com um ácido orgânico, tal como o ácido acético e/ou o ácido láctico, por exemplo, produzido pela contaminação de bactéria. Quando ativado pelo ácido, o dióxido de cloro é um biocida de amplo espectro, capaz de eliminar o impacto deletério da contaminação da bactéria em um sistema de fermentação. O dióxido de cloro estabilizado também pode ser referido como um "precursor do dióxido de cloro" ou abreviado no presente como "SCD".

Entre o complexo de oxi-cloro contendo dióxido de cloro preferido é selecionado a partir do grupo que consiste em um complexo de dióxido de cloro com carbonato, complexo de dióxido de cloro com bicarbonato e suas misturas. Os exemplos de componentes contendo clorito incluem os cloritos metálicos e, em particular, os cloritos de metal alcalino e de metal alcalino terroso. Um exemplo específico de um componente contendo clorito que é útil como um precursor de dióxido de cloro é o clorito de sódio, que pode ser utilizado como um clorito de sódio de grau técnico. A composição química exata de muitos do dióxido de cloro estabilizado e, em particular, os complexos de dióxido de cloro, não são completamente entendidos. A fabricação ou a produção de certos precursores de dióxido de cloro são descritas por Gordon, patente US 3.585.147 e Lovely, patente US 3.591.515. Os exemplos específicos de dióxido de cloro estabilizados úteis incluem, por exemplo, o Anthium Dioxide, disponível pela International Dioxide Inc., North Kingstown, RI; Oxine e Purogene, disponível pela Bio-Cide International, Inc., Norman, OK.

O dióxido de cloro estabilizado (precursor do dióxido de cloro), SCD, pode ser fornecido em um meio líquido em uma concentração pré-determinada, por exemplo, uma concentração selecionada para fornecer uma quantidade desinfetante de dióxido de cloro em resposta a pelo menos um fator exceto a presença dos ácidos orgânicos a ser reduzida. Preferencialmente, o meio líquido possui SCD suficiente de modo a possuir uma concentração

potencial de dióxido de cloro no intervalo de cerca de 0,002% a cerca de 40% em peso, de preferência, no intervalo de cerca de 2% a cerca de 25% em peso, de maior preferência, no intervalo de cerca de 5% a cerca de 15% em peso, com base no peso total do meio líquido incluindo os complexos contendo dióxido de cloro e/ou um ou mais componentes contendo cloro e/ou uma ou mais outras entidades capazes de formar o dióxido de cloro.

O dióxido de cloro estabilizado pode ser fornecido como um material sólido, tal como uma composição que compreende um pó de clorito de metal alcalino ou alcalino terroso, ingredientes inertes e, opcionalmente, um ativador seco, tal como um ácido seco. De preferência, o clorito de metal é um clorito de metal alcalino, de maior preferência, o clorito de sódio.

O dióxido de cloro estabilizado é ativado *in situ* pela diminuição do pH a menos de um pH 8, por exemplo, pela adição de ácido, metais e/ou pela produção de ácido *in situ*, por exemplo, a partir de certas bactérias produtoras de ácido. Quanto menor o pH, mais rápido o SCD é ativado. Para os propósitos no presente, o SCD permanece inativo na solução até o ácido ser gerado, que converte o SCD em dióxido de cloro ativado. Quanto mais ácidos são gerados, mais dióxido de cloro ativado é produzido. O dióxido de cloro ativado destrói a bactéria ao reagir com uma série de componentes celulares (proteínas, lipídeos, etc.). Uma vez que o dióxido de cloro ataca múltiplos locais da célula ou dentro dela, não é provável que ocorra uma resistência, um problema conhecido com os antibióticos.

PROCESSO

A presente invenção é um processo para evitar substancialmente o crescimento de bactéria em um sistema de fermentação que compreende a introdução de um açúcar fermentável, um inoculante e um dióxido de cloro estabilizado em um sistema de fermentação. O SCD é adicionado em concentrações no sistema de fermentação do ácido acético não superiores a

0,30% (peso/ volume) e de ácido láctico não superiores a 0,60% (peso/ volume) em uma quantidade eficaz para evitar substancialmente o crescimento da bactéria. É conhecido dos técnicos no assunto que o ácido acético e o ácido láctico podem estar presentes em pequenas quantidades em um sistema de fermentação, isto é, sem crescimento substancial da bactéria. Estes ácidos orgânicos podem se formar como um subproduto da fermentação do açúcar pela levedura. Ao que se revelou a exposição do SCD a pequenas quantidades de ácido gera o dióxido de cloro ativado, não há substancialmente efeito adverso no inoculante (por exemplo, levedura), no processo de fermentação e no rendimento de etanol.

O SCD pode ser adicionado ao açúcar fermentável ou no inoculante antes de sua introdução no sistema de fermentação. O processo de fermentação pode ser em batelada ou contínuo. Por "sistema de fermentação", entende-se no presente como se referindo ao trem de liquefação de fluxo em batelada ou contínuo e aos tanques de fermentação, recipientes, reatores, trocadores de calor, encanamento (tal como um reator de fluxo em pistão) ou suas combinações em que a fermentação do açúcar ocorre. Alternativamente ou em adição, o SCD pode ser adicionado como uma corrente separada do sistema de fermentação, separada do açúcar fermentável e do inoculante. Em um processo em batelada, o SCD pode ser, alternativamente, adicionado antes, durante e/ou depois da adição do açúcar fermentável e/ou do inoculante no sistema de fermentação. Quando o inoculante é a levedura, o SCD pode ser adicionado no tanque de propagação da levedura. De preferência, o SCD será adicionado antes da adição do açúcar fermentável ou antes da adição do inoculante no sistema de fermentação para conquistar os melhores resultados. De maior preferência, o SCD é adicionado antes da adição do inoculante, especialmente quando o inoculante é a levedura. O SCD deve ser adicionado ao açúcar fermentável, inoculante ou sistema de fermentação em

concentrações no sistema de ácido acético não superiores a 0,30% (peso/ volume) e de ácido láctico não superiores a 0,60% (peso/ volume). Nestas concentrações de ácido, não há efeito substancialmente prejudicial no processo de fermentação da bactéria.

5 O dióxido de cloro estabilizado é adicionado em uma quantidade eficaz. Por "quantidade eficaz" entende-se uma quantidade que é capaz de gerar dióxido de cloro ativado suficiente no sistema de fermentação para evitar substancialmente o crescimento da bactéria sem afetar de modo adverso o processo de fermentação. Por "evitar substancialmente o crescimento da

10 bactéria" entende-se que a concentração no sistema de fermentação do ácido acético não é superior a 0,30% (peso/ volume) e a concentração de ácido láctico não é superior a 0,60% (peso/ volume) de ácido. Tais condições permitem que o inoculante converta rapidamente e efetivamente o açúcar fermentável em etanol. Portanto, no processo da presente invenção, há uma

15 redução na produção de ácido com relação à operação na ausência de uma quantidade eficaz de dióxido de cloro estabilizado. Além disso, no processo da presente invenção, também há uma redução na produção de ácido e um aumento na produção de etanol com relação ao tratamento corretivo com SCD em um processo infectado. No tratamento corretivo, a produção de ácido e a

20 perda no rendimento de etanol ocorrem antes do SCD corretivo adicionado começar a agir. No processo da presente invenção, com relação ao tratamento corretivo, também há uma perda mínima no tempo do ciclo, ou no rendimento do etanol.

O dióxido de cloro estabilizado é adicionado em uma

25 quantidade eficaz para evitar substancialmente o crescimento da bactéria, mas possui pouco impacto nas principais variáveis no processo de fermentação. Esta quantidade será, tipicamente, de cerca de 0,0001 a cerca de 5% com base no peso do dióxido de cloro ativado que pode ser

produzido e no peso total dos conteúdos do sistema de fermentação – quando todos os reagentes foram adicionados no sistema. Será entendido que a quantidade de SCD necessária irá depender da carga de bactéria total introduzida no sistema. Outros fatores a se considerar na
5 determinação da quantidade de SCD a ser adicionada incluem o momento da adição de inoculante (levedura) e pH. De preferência, a quantidade de SCD adicionada é de cerca de 0,01 a cerca de 3%, de maior preferência, de cerca de 0,1 a cerca de 2% do volume total do material no recipiente de fermentação. Esta quantidade é substancial o
10 suficiente para minimizar interrupções no processo devido à contaminação bacteriana e para eliminar a necessidade por outros biocidas ou antibióticos. Será entendido pelos técnicos no assunto que a concentração de SCD introduzida no processo de fermentação pode variar dependendo da concentração de dióxido de cloro dissolvido
15 disponível na solução de SCD sendo adicionada.

Ao operar uma usina de fermentação de acordo com a presente invenção, um velocidade reduzida na freqüência, com eliminação potencial e efeitos deletérios da infecção bacteriana é obtida. Portanto, no processo da presente invenção, a produtividade em longo prazo e o lucro aumentam na
20 operação de uma usina de fermentação.

É reconhecido que os resultados individuais em diferentes usinas de fermentação de etanol que operam em diferentes condições podem variar nos melhoramentos relativos no processo da presente invenção, tal como, na redução da produção de ácido e no aumento da produção de etanol com relação à ausência de
25 SCD ou com relação à adição de SCD corretivo.

No processo da presente invenção, a fermentação ocorre em um sistema de fermentação em batelada ou contínuo. A mistura do produto do sistema de fermentação compreende o etanol, a água, inoculante, sólidos do grão e o SCD

não reagido. Após a descarga do sistema de fermentação, as etapas do processo convencionais para a separação e a purificação ou outros processamentos do etanol podem ser realizadas. O produto de fermentação pode ser destilado para separar o etanol do volume de água presente e dos sólidos (que inclui inoculantes e sólidos do grão). Os sólidos podem ser recuperados. O etanol destilado pode ser ainda tratado, por exemplo, pelo contato com peneiras moleculares, para remover a água remanescente, tal que o produto de etanol é essencialmente 100% etanol puro (200 proof). Na produção de bebida, o envelhecimento, mistura ou outros processamentos podem ser requeridos. O etanol de combustível purificado é geralmente tratado com um agente desnaturante. O dióxido de carbono coproduzido e os sólidos também podem ser recuperados.

Os sólidos recuperados podem ser utilizados na ração animal e misturados com grãos do destilador. Vantajosamente, os sólidos recuperados compreendem o SCD, que, quando adicionados aos grãos do destilador úmidos, pode prolongar sua vida de prateleira. Outras vantagens, tais como o controle do odor, também podem ser obtidas.

EXEMPLOS

Nos seguintes exemplos, o dióxido de cloro estabilizado que foi utilizado era o Anthium Dioxide, disponível pela International Dioxide Inc., North Kingstwn, RI, como uma solução contendo 5% de dióxido de cloro quando ativada.

A bactéria viável total nas amostras no presente foi medida como uma concentração de unidades formadoras de colônia (CFU) por unidade de volume (isto é, CFU/mL) ou por unidade de massa (isto é, CFU/g) de amostra (Exemplo 1 e Exemplo 2), ou com base nas leituras de densidade óptica utilizando um espectrômetro (Exemplo 3). A densidade óptica conforme medida utilizando o espectrofotômetro representa a quantidade de luz de comprimento de onda específico (450 nm) absorvida pelas células bacterianas e é diretamente proporcional à concentração de bactéria na amostra. Isto é, quanto maior a

concentração de células na suspensão, maior a densidade óptica da amostra, e vice versa. Quando utilizada para comparar as células bacterianas expostas às condições variadas, as menores densidades ópticas indicam a inibição do crescimento bacteriano. Também é entendido que há uma correlação direta da
5 concentração de bactéria nas amostras e a medida de CFU. Portanto, quanto maior a concentração de bactéria, maior o CFU e vice-versa. Como convenção, os CFUs são transformados matematicamente em valores de logaritmo (\log_{10} CFU) para simplificar as comparações entre os diferentes tratamentos.

EXEMPLO 1

10 As amostras de massa coletadas a partir de uma usina de processamento de etanol comercial forneceram o açúcar fermentável utilizado neste exemplo. As amostras foram coletadas a partir da corrente do processo imediatamente após a liquefação, pouco antes da introdução do inoculante (levedura) ou qualquer um de outros ingredientes (uréia, enzimas, antibióticos) no
15 sistema. As amostras foram armazenadas em um refrigerador em uma temperatura de 4° C (39° F) por cinco dias antes do teste. As amostras de massa foram expostas a concentrações variadas de dióxido de cloro estabilizado (SCD) conforme segue: 25 mL da massa foram transferidos em 50 mL de tubos de centrifuga, que foram então aquecidos a 33° C (92° F) em um banho de água. O
20 SCD foi adicionado nas amostras de massa para atingir as concentrações de dióxido de cloro na massa de 62,5 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 150 ppm e 250 ppm. Em uma amostra controle, nenhum SCD foi adicionado na massa.

As amostras tratadas e a amostra controle foram mantidas no banho de água por 30 minutos, após o qual as bactérias sobreviventes foram enumeradas
25 utilizando os métodos microbiológicos padrão. Estes métodos acarretam a diluição de cada amostra por um fator grande o suficiente para permitir a separação clara das colônias bacterianas individuais no meio de crescimento sólido, no presente referido como um fator de diluição, permitindo deste modo que as colônias sejam

contadas individualmente. Neste exemplo, o meio de crescimento era o Agar MRS, disponível pela Difco Laboratories, Sparks, MD, em que a bactérias produtoras do ácido orgânico são conhecidas por crescerem. Os métodos padrão também acarretam a incubação de placas de ágar sobre as quais as amostras diluídas foram depositadas/ espalhadas. Neste exemplo, as placas foram incubadas a 33° C por 48 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os resultados são fornecidos abaixo na Tabela 1. A Contagem 1 e a Contagem 2 indicam as contagens de colônia bacteriana em cada um dos experimentos duplicados. A média é baseada na Contagem 1 e na Contagem 2.

TABELA 1

BACTÉRIA VIÁVEL RECUPERADA DE AMOSTRAS DE MASSAS APÓS A EXPOSIÇÃO AO

SCD POR 30 MINUTOS

Concentração de SCD na massa	Contagem		Média	Fator de diluição	CFU/mL	Log CFU/mL
	1	2				
(Controle) 0 ppm	704	900	802	10.000	80.200.000	7,9
62,5 ppm	40	89	64,5	10.000	6.450.000	6,81
75 ppm	320	270	295	10.000	2.950.000	6,47
100 ppm	200	360	280	10.000	2.800.000	6,45
150 ppm	26	28	27	100	2.700	3,43
250 ppm	25	29	27	10	270	2,43

O número de bactéria viável na massa tratada com o SCD foi menor do que as amostras de massa não tratadas. Maiores cargas de SCD resultaram em menos bactéria nas amostras.

EXEMPLO 2

Durante o processo de fermentação normal na usina de etanol moída a seco, duzentos e setenta (270) galões (1.000 litros) de SCD foram adicionado em

um fermentador pouco antes do preenchimento com a massa e antes da adição de levedura, enzimas e uréia no fermentador. Não foram adicionados compostos antibióticos no fermentador. Neste processo, o fermentador foi preenchido com massa fluente a 660 galões por minutos até um volume de 660.000 galões. A

5 concentração de SCD adicionada no recipiente variou, portanto, conforme o volume da massa aumentava. Isto é, conforme o preenchimento começou, o SCD foi gradualmente diluído até uma concentração final de 0,041%. O SCD utilizado neste exemplo era uma solução contendo 5% de dióxido de cloro ativo. 3.500 galões

10 (28.000 litros) de suspensão de levedura na massa contendo cerca de $1,0 \times 10^8$ células por mL foi adicionada a partir do tanque de propagação de levedura após 90 minutos de preenchimento. Quando todos os componentes foram adicionados no recipiente de fermentação, a concentração de antibióticos (Virginiamycin) e uréia eram 0,0001% e 0,0016%, respectivamente. Os indicadores do desempenho de fermentação foram monitorados como de costume e são mostrados na Tabela 2.

15 Os dados foram coletados das bateladas de fermentação operando simultaneamente em cada condição e meios calculados. A Tabela 2 representa as médias de 16 bateladas de fermentações utilizando antibióticos e 15 bateladas de fermentação em que o SCD foi adicionado.

TABELA 2**PARÂMETROS CHAVE PARA AS FERMENTAÇÕES EM BATELADA**

Tratado com antibiótico							
	pH	Temp. (°C)	Açúcares, %	Ácido láctico, %	Glicerol, %	Ácido acético, %	Etanol, %
Inoculante	5,38	37	9,10	0,07	0,39	0,02	0,74
10 horas	5,47	33	23,53	0,18	0,80	0,03	1,32
22 horas	4,81	32	11,54	0,28	1,46	0,02	7,53
36 horas	4,76	30	3,94	0,32	1,67	0,03	11,64
Gota	4,91	29	1,14	0,35	1,72	0,05	13,81

20

Tratado com SCD							
	pH	Temp. (°C)	Açúcares, %	Ácido láctico, %	Glicerol, %	Ácido acético, %	Etanol, %
Inoculante	5,39	37	8,94	0,07	0,40	0,02	0,92
10 horas	5,60	33	24,70	0,15	0,75	0,03	1,00
22 horas	4,84	33	13,69	0,23	1,40	0,01	6,53
36 horas	4,74	29	5,75	0,25	1,66	0,02	10,91
Gota	4,88	29	1,14	0,25	1,77	0,04	14,08

Conforme pode ser observado pela Tabela 2, o rendimento médio de etanol no final da fermentação (Gota) para a fermentação tratado com SCD foi maior do que tratado com antibiótico. A concentração média de ácido láctico e acético também foi menor para o fermentador tratado com SCD. Portanto, a utilização de SCD ao invés de antibiótico aumenta o rendimento do etanol, sendo que em uma usina que produza 56 milhões de galões (212 milhões de litros) por ano de etanol, um adicional de 1,1 milhão de galões (4,2 milhões de litros) por ano são produzidos. Com um preço de \$ 2,20 por galão a produção aumentada representa uma revisão anual adicional de \$ 2,35 milhão.

10

EXEMPLO 3

Culturas puras de bactérias produtoras de ácido láctico foram isoladas e identificadas a partir de amostras de massa obtidas previamente a partir de um processo de fermentação comercial. Três dos isolados que foram mais frequentemente identificados foram combinados em um coquetel e expostos em concentrações crescente de SCD em um caldo MRS (Difco, Sparks, MD, EUA), um meio seletivo para a bactéria produtora do ácido láctico. As espécies utilizadas foram *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei* e o *Leuconostoc citreum*. Os três isolados foram cultivados durante a noite em ágar MRS, então lavados com um tampão fosfato, (pH 6,4), misturados e a densidade celular total foi ajustada com o tampão para resultar em cerca de

20

10⁴ CFU/mL de células viáveis em um meio de crescimento líquido. A suspensão celular no meio líquido foi combinada com SCD em concentrações de dióxido de cloro ativo de 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm e 150 ppm em placas de micro-titulação de 96 poços.

5 As leituras de densidade óptica de cada poço foram registradas em intervalos de 2 horas por 22 horas utilizando um leitor de placas de micro-titulação automatizado. A densidade óptica indica a concentração de células de bactérias no meio. A maior turvação das amostras indica maior concentração de bactéria no meio.

10 As bactérias expostas a diversos níveis de SCD exibem menores densidades ópticas comparadas às células não tratadas durante o mesmo período de tempo de 22 horas. A Figura 1 ilustra que ao incluir o SCD no meio de crescimento, a concentração de bactéria pode ser diminuída e sua velocidade de crescimento controlada, conforme medido pela densidade óptica
15 da suspensão.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA EVITAR SUBSTANCIALMENTE O CRESCIMENTO DE BACTÉRIA, em um sistema de fermentação, caracterizado pelo fato de que compreende a introdução de um açúcar fermentável, um inoculante e um dióxido de cloro estabilizado em um sistema de fermentação, em que o inoculante converte o açúcar em etanol e dióxido de carbono; em que o dióxido de cloro estabilizado é adicionado, em uma quantidade eficaz para evitar substancialmente o crescimento de bactéria, a um ou mais açúcares fermentáveis, ao inoculante ou ao sistema de fermentação, com concentrações no sistema de fermentação de ácido acético não superiores a 0,30% (peso/volume) e ácido láctico não superiores a 0,60% (peso/volume), e ainda em que a quantidade de dióxido de cloro estabilizado é de cerca de 0,0001 a cerca de 5%, com base no peso do dióxido de cloro ativado que pode ser produzido e o peso total do sistema de fermentação.

2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dióxido de cloro estabilizado é adicionado antes da adição do açúcar fermentável ou antes da adição de inoculante no sistema de fermentação.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dióxido de cloro estabilizado é adicionado em uma quantidade de cerca de 0,01% a cerca de 3% com base no peso do dióxido de cloro ativado que pode ser produzido e o peso total dos conteúdos do fermentador.

4. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o dióxido de cloro estabilizado é adicionado em uma quantidade de cerca de 0,1% a cerca de 2% com base no peso do dióxido de cloro ativado que pode ser produzido e do peso total dos conteúdos do fermentador.

5. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o dióxido de cloro estabilizado é um complexo de oxi-cloro contendo dióxido de cloro que é um complexo de dióxido de cloro com carbonato, dióxido de cloro com bicarbonato ou uma mistura dos mesmos.

6. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o dióxido de cloro estabilizado é um componente contendo clorito, que é um ou mais cloritos metálicos.

7. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o açúcar fermentável é derivado de um ou mais de: milho, aparas de madeira, palha de trigo, forragem de milho, *switch grass (Panicum virgatum)*, sorgo (*milo*), cevada, painço, sorgo, cana de açúcar, açúcar de beterraba, melação, soro do leite, batatas.

8. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o açúcar fermentável é derivado do milho.

9. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o açúcar fermentável está presente no sistema de fermentação em uma concentração de cerca de 5 a cerca de 40% (peso/ volume).

10. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o açúcar fermentável é derivado do milho e está presente no sistema de fermentação em uma concentração na faixa de cerca de 10 a 35% (peso/ volume); o inoculante é a levedura; o dióxido de cloro estabilizado é adicionado no sistema de fermentação antes da adição do açúcar fermentável ou antes da adição do inoculante no sistema de fermentação; o dióxido de cloro estabilizado é adicionado em uma quantidade de cerca de 0,01% a cerca de 3% com base no peso do dióxido de cloro ativado que pode ser produzido e do peso total dos conteúdos do fermentador;

o dióxido de cloro estabilizado é um clorito de metal alcalino ou um clorito de metal alcalino terroso, que é fornecido em um meio líquido em uma concentração que apresenta uma concentração potencial de dióxido de cloro ativado no intervalo de cerca de 2% a cerca de 25% em peso, com base no peso total do meio líquido.

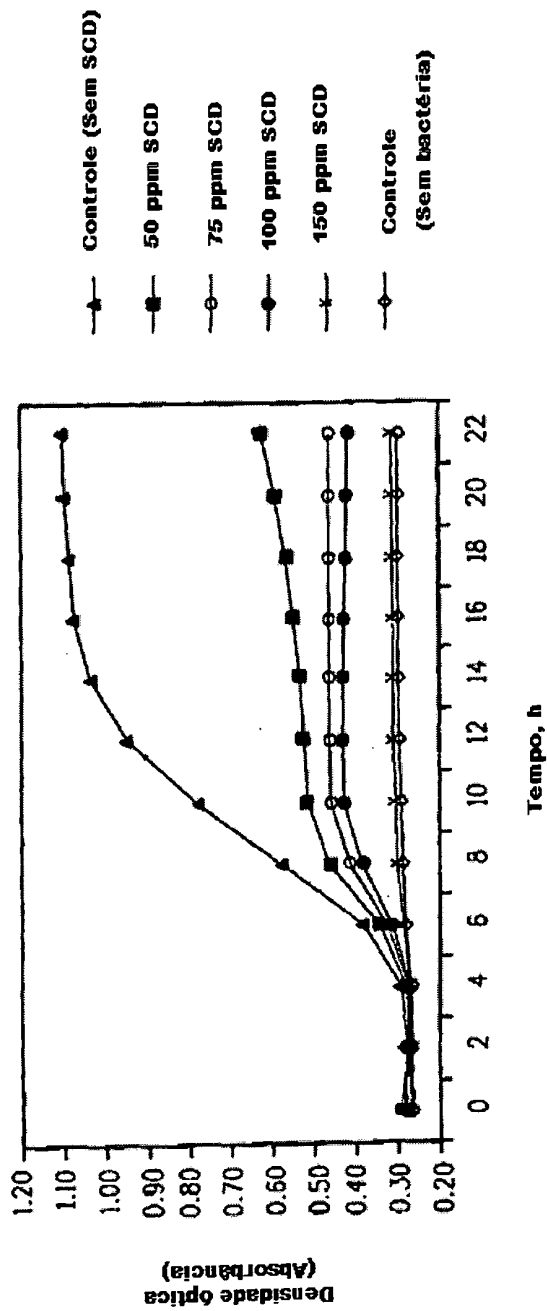


Fig. 1

RESUMO**“PROCESSO PARA EVITAR SUBSTANCIALMENTE O CRESCIMENTO DE BACTÉRIA EM UM SISTEMA DE FERMENTAÇÃO”**

A presente invenção se refere a um processo de fermentação para a produção de etanol a partir de fontes naturais, tais como milho, que compreende a introdução de um açúcar fermentável, um inoculante e um dióxido de cloro estabilizado em um sistema de fermentação. O dióxido de cloro estabilizado é adicionado preventivamente ao sistema de fermentação em concentrações no sistema de fermentação de ácido acético não superiores a 0,30% (peso/ volume) e de ácido láctico não superiores a 0,60% (peso/ volume). O dióxido de cloro estabilizado é adicionado em uma quantidade efetiva para prevenir substancialmente o crescimento de bactéria.