



* B R 1 1 2 0 1 8 0 0 9 8 6 3 B 1 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112018009863-9 B1

(22) Data do Depósito: 04/08/2016

(45) Data de Concessão: 17/09/2024

(54) Título: LINHAGEM DE LEVEDURA MODIFICADA SACCHAROMYCES CEREVISIAE, SEU MÉTODO DE OBTENÇÃO E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ETANOL USANDO A MESMA

(51) Int.Cl.: C12N 1/18; A01H 1/00; A01H 1/06; C12N 15/09; C40B 10/00.

(30) Prioridade Unionista: 25/11/2015 IN 4425/MUM/2015.

(73) Titular(es): RAJENDRA SURANA.

(72) Inventor(es): RAJENDRA SURANA; SHASHIKANT SHINGDILWAR; PUSHPA AGRAWAL.

(86) Pedido PCT: PCT IN2016050260 de 04/08/2016

(87) Publicação PCT: WO 2017/090055 de 01/06/2017

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/05/2018

(57) Resumo: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE GRANDE QUANTIDADE DE ETANOL EM TEMPERATURA ALTA POR LINHAGEM DE LEVEDURA MODIFICADA SACCHAROMYCES CEREVISIAE. A presente invenção refere-se a uma linhagem de levedura modificada de Saccharomyces cerevisiae tendo número de acesso MCC 0069 com propriedades osmotolerante, termotolerante, tolerante a etanol e autofloculação. Ainda, a presente invenção refere-se a um método para obtenção de linhagem de levedura modificada. A presente invenção refere-se também a um método de produção de etanol em temperatura alta usando a dita linhagem de levedura. O etanol produto através do método descrito na presente invenção é usado como combustível.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"LINHAGEM DE LEVEDURA MODIFICADA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, SEU MÉTODO DE OBTENÇÃO E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ETANOL USANDO A MESMA".

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a uma linhagem de levedura modificada *Saccharomyces cerevisiae* Devleela-1 depositada na IDA, *Microbial Culture Collection*, Puna, Índia, tendo um número de acesso MCC 0069 e um método de produção de grande quantidade de etanol em temperatura alta pela linhagem de levedura modificada. Mais especificamente, a linhagem de levedura modificada *Saccharomyces cerevisiae* produz etanol em uma faixa de temperatura de 25° C a 44°C em concentração alta. A linhagem de levedura modificada é osmotolerante, tolerante a etanol, termotolerante e autofloculante.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A depleção de recursos de combustível fóssil criou uma situação para a demanda contínua e crescente por energia renovável. Uma das fontes mais comuns de combustível é o etanol, que é misturado com petróleo. O etanol é usado por outras indústrias também, desta maneira há uma crescente demanda por etanol. Existem vários métodos onde ou material de planta inteira ou grão inteiro é convertido em amido, que seria separado da fonte original ou o amido é diretamente convertido em açúcar antes da fermentação. Existem também métodos onde melaço ou suco da cana-de-açúcar, melaço da raiz de beterraba é usado para fermentação para produzir etanol. Fermentação é então realizada usando diferentes linhagens de levedura. Em qualquer caso, é importante ter uma linhagem de levedura que possa produzir quantidade grande de etanol no menor tempo possível.

[003] Após fermentação, etanol é destilado, purificado,

concentrado e desidratado antes de ser usado ou como etanol combustível ou como etanol potável ou para outras aplicações industriais. Desta maneira, quanto maior a concentração de etanol no caldo de fermentação, menor será o custo de processamento a jusante. Uma boa recuperação após fermentação também reduz a quantidade de afluente necessária ser processada antes da sua liberação para o ambiente. Desta maneira, uma boa linhagem comercial de levedura deveria produzir concentração alta de etanol razão pela qual ela deveria ser capaz de crescer em alta concentração de açúcar (osmotolerante), na presença de alta concentração de etanol (tolerante a etanol), em alta temperatura (termotolerante) e deveria ser autofloculante. Termotolerância de linhagem de levedura é uma das propriedades mais desejáveis de qualquer linhagem de levedura comercial/industrial uma vez que a canas-de-açúcar crescendo em regiões em todo o mundo têm estação longa de temperatura ambiental alta, desta maneira, ter uma linhagem de levedura que produza concentração alta de etanol em temperatura alta será um fato de grande importância para a indústria de etanol.

[004] Autofloculação é uma propriedade desejável de levedura para fermentação de etanol. Floculação significa que uma vez a fermentação ou agitação tendo terminado, a maior parte da população de micróbio se depositará no fundo. Desta maneira, autofloculação ajuda durante o processo de destilação. Se a linhagem não acumular no fundo, então ela tende a bloquear a coluna de destilação.

[005] Há vários fatores de estresse sinérgico envolvidos em produção de etanol usando levedura. A levedura cresce em faixa de temperatura ótima de 25°C-32°C. Acima desta faixa de temperatura há uma depressão em fermentação. Temperatura alta causa uma diminuição em viabilidade celular, bem como mudanças em mitocôndria e fluidez da membrana plasmática e ela também aumenta a

sensibilidade da levedura a ácidos láctico e acético, o que causa rendimentos de etanol menores. Ainda, grande quantidade de etanol pode causar mudanças metabólicas importantes em leveduras tais como inibição de ATPase, desnaturação de várias enzimas glicolíticas e mudanças na parede celular.

[006] Os processos em produção de etanol envolvem o uso de melação e suco de cana-de-açúcar ou outra fonte de açúcares tais como materiais de planta ou grãos, sua moagem ou úmidos ou sólidos, conversão do amido e outro material lignocelulósico dessas matérias-primas em açúcar e então uso de linhagem de levedura para converter açúcares em etanol através do processo de fermentação em temperatura ambiente é bem documentado na literatura. No entanto, há desafios envolvidos em temperatura alta.

[007] São feitos esforços por todos os versados na técnica para aperfeiçoar o processo de fermentação de etanol ao aperfeiçoar as propriedades de linhagem de levedura a ser usada e algumas vezes modificando o processo de fermentação (Benjaphokee e outros, 2012, *N. Biotechnol.* 29(3)379-386; Lu e outros, 2012, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39(1) 73-80; Morimura e outros, 1997, *J. Ferment. Bioeng.* 83(3) 271-274; Banat e outros, 1992, *W. J. Microbiol Biotechnol.* 8(3)259-263). É estimado que menos de 1% de aumento em rendimento de etanol gere um valor comercial de 100 milhões de dólares anualmente para a indústria do etanol. O artigo intitulado "Effects of fermentation temperatura on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*" de Torija, M. J., *International Journal of Food Microbiology*, 2003, Jan 15; 80(1): 47-53 relata que a viabilidade de células de levedura diminuiu em temperatura alta, especialmente a 35° C. É também relatado que rendimento de álcool é menor em temperatura alta devido a efeito inibidor de etanol em temperatura alta.

[008] A Patente CN 103232948 B descreve uma linhagem de

Saccharomyces cerevisiae resistente à temperatura alta e métodos de cultivo. O documento citado descreve rendimento de etanol de 3,9% (v/v) em temperatura alta de 38°C. Ainda, ela descreve rendimento de etanol de 12,2% (v/v) em temperatura alta de 40°C. O WO 2014/170330 descreve alelos de levedura envolvidos em capacidade máxima de acúmulo de álcool e tolerância a níveis de álcool altos.

[009] A EP2837698A1 descreve linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* tendo tolerância a etanol em concentrações entre 14% (v/v) – 16% (v/v). Esta linhagem pode ser usada em produção de alimento através de fermentação (incluindo bebidas), preferivelmente obtida por fermentações de mostos tal como vinho, cerveja ou cidra. A fermentação é conduzida em uma temperatura na faixa de a partir de 16° C a 28° C.

[0010] O WO 2014180820 A2 descreve célula de levedura que é geneticamente modificada tendo uma osmotolerância de 0,5 OsM ou mais.

[0011] Desta maneira, há uma necessidade na técnica de desenvolver uma linhagem de levedura modificada produzindo grande quantidade de etanol tendo propriedades tais como termotolerância, osmotolerância, tolerância a etanol, que autoflocula. O método aperfeiçoado para produção de etanol provendo concentração alta de etanol tem vantagens econômicas, ambientais e industriais significantes.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[0012] O principal objetivo da presente invenção é prover uma linhagem de levedura modificada *Saccharomyces cerevisiae* tendo número de acesso MCC 0069 e tendo propriedades tais como termotolerância, osmotolerância, tolerância a etanol e autofloculação.

[0013] Um outro objetivo da presente invenção é prover um método para produção de etanol por linhagem de levedura modificada.

[0014] Ainda um outro objetivo da presente invenção é prover um método para obtenção de linhagem de levedura modificada.

[0015] Ainda um outro objetivo da presente invenção é prover um método para produção de etanol a ser usado como combustível, solvente, etanol potável ou para aplicação industrial.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0016] A presente invenção provê uma linhagem de levedura modificada *Saccharomyces cerevisiae* tendo um número de acesso MCC 0069 e tendo propriedades de termotolerância, osmotolerância, tolerância a etanol e autofloculação. Em uma modalidade da presente invenção, a linhagem de levedura modificada tendo um número de acesso MCC 0069 é naturalmente selecionada e exposta à UV.

[0017] Uma modalidade da invenção também inclui métodos de utilização da linhagem modificada de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para produzir grande quantidade de etanol.

[0018] Em uma outra modalidade da invenção, a linhagem de levedura modificada é termotolerante.

[0019] Em uma modalidade adicional da invenção, a linhagem de levedura modificada é osmotolerante uma vez que ela cresce e fermenta em concentração alta de sacarose e outros mono- e dissacarídeos e produz concentração/rendimento alto de etanol, desta maneira é também tolerante a etanol.

[0020] Em uma outra modalidade da invenção, a linhagem de levedura modificada é autofloculante.

[0021] Em ainda uma outra modalidade da invenção, produção alta de etanol é obtida usando linhagem de levedura modificada *Saccharomyces cerevisiae* em alta temperatura, alta concentração de açúcar e alta concentração de etanol resulta em custo significativamente menor de entrada, processamento a jusante aperfeiçoado e redução em quantidade de afluente, desta maneira reduzindo o custo de tratamento

de afluyente.

[0022] Em uma outra modalidade da invenção, um método para obtenção da linhagem de levedura modificada compreende as etapas de:

a) submissão da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* a uma faixa de temperatura de 45°C a 47°C e uma concentração de açúcar fermentável de 20% para obter uma linhagem selecionada; e

b) tratamento da dita linhagem selecionada com luz ultravioleta para obter a linhagem de levedura modificada.

[0023] Em uma modalidade da presente invenção, é provido um método para produção de etanol a ser usado como combustível, solvente, etanol potável e para aplicação industrial.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0024] A Figura 1 refere-se à produção de etanol a 30° C usando melaço de cana de açúcar 20% por levedura modificada onde o eixo X representa tempo de incubação em horas e o eixo Y representa porcentagem de etanol.

[0025] A Figura 2 refere-se à produção de etanol a 37° C usando melaço de cana-de-açúcar por levedura modificada onde o eixo X representa tempo de incubação em horas e o eixo Y representa a porcentagem de etanol.

[0026] A Figura 3 refere-se à produção de etanol a 42° C usando melaço de cana-de-açúcar 20% por levedura modificada onde o eixo X representa tempo de incubação em horas e o eixo Y representa a porcentagem de etanol.

[0027] A Figura 4 refere-se à comparação de produção de etanol por linhagem isolada de levedura e linhagem modificada de levedura a 30° C usando melaço de cana-de-açúcar como substrato em 8 h, 10 horas, 12 horas e 24 horas de incubação. A série 1 representa linhagem isolada não modificada de levedura e a série 2 representa linhagem

modificada de levedura. O eixo X representa tempo de incubação e eixo Y representa porcentagem de etanol.

[0028] A Figura 5 refere-se à comparação de produção de etanol por linhagem isolada de levedura e linhagem modificada de levedura a 37° C usando melaço de cana-de-açúcar como substrato em 48 h, 54 h e 72 h de incubação. A série 1 representa linhagem isolada não modificada de levedura e a série 2 representa linhagem modificada de levedura. O eixo X representa tempo de incubação e o eixo Y representa porcentagem de etanol.

[0029] A Figura 6 refere-se a perfil de HPLC (A) perfil de HPLC de etanol produzido na presente invenção [perfil de HPLC mostra que produção de etanol durante fermentação de melaço de cana-de-açúcar é quase livre de qualquer contaminação]; (B) perfil de HPLC de etanol puro.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0030] Deve ser notado que qualquer terminologia usada aqui não é para descrever uma modalidade particular apenas e não é limitante em seu escopo ou de outro modo. Exemplos são: uso de formas no singular "um", "uma" e "o", "a" pode também incluir referências no plural a menos que claramente indicado ou mencionado no texto. Qualquer derivado é claramente indicado no texto. Por exemplo, "um elemento" ou "um método" poderia significar um ou mais elementos e um ou mais métodos. Todas as unidades, prefixos e símbolos podem ser denotados em sua forma aceita no SI.

[0031] Faixas numéricas como mencionado no relatório são inclusivas dos números definindo a faixa e incluem cada inteiro dentro da faixa definida.

[0032] A menos que de outro modo definido ou indicado, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como geralmente compreendido por um versado comum na técnica à qual

modalidades da presente invenção pertencem. Muitos materiais e métodos similares ou modificados ou equivalentes àqueles descritos aqui podem ser usados enquanto praticando as modalidades da presente invenção sem fazer nenhuma experimentação excessiva das quais materiais e métodos preferidos são descritos aqui. Os cabeçalhos providos enquanto descrevendo as modalidades e reivindicações da presente invenção não são uma limitação das modalidades da presente invenção. A terminologia que segue será usada de acordo com definições descritas abaixo. O termo "micro-organismo produtor de álcool ou etanol" refere-se a qualquer organismo, incluindo levedura, capaz de fermentação e produção de etanol a partir de cana-de-açúcar tais como mono-, di- ou oligo-sacarídeos originados de qualquer fonte, por exemplo, cana-de-açúcar, material lignocelulósico, grãos ou vegetais.

[0033] O termo "fermentação" significa quebra enzimática, anaeróbica, semianaeróbica ou aeróbica de substâncias orgânicas por micro-organismos em que açúcares de processo são convertidos em etanol, dióxido de carbono (produto de refugo) e energia celular. Métodos de fermentação e outras etapas ou métodos de produção de etanol através de fermentação (incluindo separação de produto final, destilação, purificação e desnaturação ou desidratação de etanol) são conhecidos e bem documentados na técnica.

[0034] O termo "osmotolerância" significa uma linhagem de levedura que pode crescer e produzir etanol a partir de concentrações altas de açúcar, onde o açúcar pode ser ou monossacarídeos, dissacarídeos ou qualquer açúcar presente após sacarificação ou de lignocelulósico ou amido de qualquer fonte.

[0035] O termo "sacarificação" significa conversão de amido ou outro material lignocelulósico em açúcares tais como monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, etc, pela ação de enzimas. Métodos

de sacarificação são bem conhecidos na técnica e podem ser realizados por qualquer versado na técnica.

[0036] O termo "tolerância a etanol (álcool)" significa habilidade de levedura em produzir e ser funcional na presença de concentração alta de etanol, tal como produzindo etanol em um meio contendo concentração alta de etanol.

[0037] O termo "termotolerância" significa uma habilidade de uma linhagem de levedura selecionada em crescer e permanecer funcional tal como produção de etanol em temperatura alta.

[0038] O termo "linhagem" significa uma linhagem de levedura funcional que é produtora de etanol sob as condições descritas na presente invenção, ou seus mutantes descritos aqui, por exemplo, a linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O termo levedura funcional ou mutantes significa uma linhagem de levedura obtida diretamente ou indiretamente através de modificação genética incluindo mutação induzida ou usando um agente químico ou luz ultravioleta ou através de seleção natural ou mutação espontânea, que pode ser obtida através de qualquer meio ou usando uma linhagem de referência que retém tolerância a etanol, termotolerância e tolerância a açúcar da linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

[0039] O termo "rendimento" em geral significa a quantidade de produto final tais como vários tipos de etanol, incluindo etanol combustível, etanol industrial ou etanol potável, produzido durante fermentação através dos métodos descritos aqui por meio de exemplos de várias modalidades. Rendimento pode também se referir à concentração, volume, porcentagem ou concentração do produto final no caldo de fermentação e através de quaisquer outros meios de medição do produto final. O produto final preferido medido na presente invenção é álcool e mais precisamente etanol, que pode ser separado, purificado e concentrado usando os métodos conhecidos daqueles

versados na técnica. Em algumas modalidades da presente invenção o rendimento de etanol usando linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* está na faixa de 9% a 21,82% v/v de etanol incluindo todos os inteiros intermediários e frações como descrito na presente invenção.

[0040] O etanol produzido pela presente invenção é usado ou como biocombustível, solvente, etanol potável ou para aplicação industrial.

Linhagem de Levedura

[0041] A presente invenção provê linhagens de levedura selecionadas do distrito de Baster do estado de Chhattisgarh, Índia, e testadas quanto à produção de etanol aperfeiçoada/aumentada em relação às linhagens industriais atualmente usadas de levedura e condições de fermentação usadas na Índia.

[0042] A linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi depositada no *Microbial Culture Collection*, Pune, Índia, que é uma Autoridade Depositária Internacional reconhecida, sob as condições do Tratado de Budapeste, e tem um número de acesso MCC 0069.

[0043] A linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi selecionada de um painel de vinte linhagens de levedura isoladas de extratos de planta de fermentação, tendo nível alto de matéria seca. Após número significativo de experimentações, é a primeira purificação da linhagem de levedura presente nos materiais de planta de fermentação, manutenção da cultura pura no laboratório, checagem de seu crescimento em temperatura alta através de inoculação das linhagens de levedura em um melaço não tratado contendo açúcar fermentável (dependendo do processo de refino de açúcar de suco de cana-de-açúcar que varia de fábrica para fábrica bem como região para região, pelo menos na Índia). As diluições foram feitas em água da torneira, misturadas com ágar-ágar, aquecidas para dissolver o ágar-ágar e então plaqueadas em placas de Petri (melaço aqui pode ser autoclavado, se requerido). Todos os vinte isolados naturais foram

cultivados adicionalmente em um meio de cultura contendo: extrato de levedura, peptona, dextrose, ágar conforme e quando necessário (o meio será conhecido como YPD) e água de vidro destilada. Diluições seriais de cada um dos isolatos naturais foram preparadas em água de vidro destilada estéril, densidade óptica foi medida e número de células/ml nesta densidade óptica foi contado espalhando-as em placas YPD. Para selecionar uma linhagem que é mais tolerante a temperaturas altas bem como concentrações de açúcar em melaço, todos os vinte isolados foram separadamente suspensos em água destilada estéril para obter um número de célula. Cada um dos isolatos foi espalhado em placas de melaço. Vinte placas de cada um dos isolatos foram incubadas em temperatura alta separadamente, até que o crescimento foi visto. Dos vinte isolatos originalmente selecionados para avaliação, dezessete não mostraram nenhum crescimento em temperatura alta, então foram descartados. Três isolatos que tinham tido um número médio de colônias crescendo por placas foram usados para investigações adicionais. No entanto, as colônias eram misturas de ambos os tamanhos pequeno e grande, desta maneira, para o próximo conjunto de experimentos todas as colônias de tamanho pequeno foram descartadas. As colônias grandes selecionadas aqui foram plaqueadas adicionalmente em placas de melaço conforme declarado acima e seu crescimento foi novamente checado. Cada uma dessas colônias foi suspensa em meio YPD e espalhada em placas de melaço com mencionado acima para obter colônia única e também para checar novamente que elas não eram uma mistura de unidades de formação de colônia pequenas e grandes de células de levedura e são clones estáveis. Neste estágio dos três isolatos selecionados para estudo adicional, dois foram descartados como a colônia simples desses dois isolatos produzidos novamente uma mistura de colônias pequenas e grandes, indicando que esses isolatos eram instáveis em processo de

seleção rigoroso (temperatura alta e concentração de açúcar alto de melaço) usado aqui. Na presente configuração experimental, cada colônia se originaria de uma célula de levedura única e os experimentos foram projetados para selecionar um mutante presente na população que fermentaria concentração alta de açúcar para produzir quantidade grande de etanol em temperatura alta. Após novo plaqueamento, três colônias (daqui em diante referidas como clones) que tinham mostrado bom crescimento em alta temperatura em placas de melaço foram selecionadas para estudo adicional. A repetição de estudos de crescimento com esses clones como descrito antes aqui mostrou que todas as três colônias produziram colônias de tamanho uniforme que indicou que esses clones eram estáveis em concentração de açúcar alta bem como temperatura alta. Todos os três clones foram então testados quanto à produção de etanol a partir de melaço sem nenhuma suplementação. Aqui, novamente dois dos clones foram descartados porque a produção de álcool era baixa. A quantidade de álcool produzida pelos dois ditos clones era ~12% de álcool a 37° C e 40° C, enquanto o terceiro clone produziu ~14% de álcool ambos a 37° C e 40° C, mas havia cerca de 7-8% de açúcar residual. Finalmente, apenas um clone foi selecionado. 10×10^6 células por ml em água destilada estéril deste clone (5 ml em placa de Petri estéril com diâmetro de ~9 centímetros) foram expostas à luz UV [ultravioleta] e plaqueadas em placa de melaço contendo ~20% de açúcar fermentável a 45-47° C. Durante o processo de seleção, melaço não purificado foi usado, o qual contém quantidades muito grandes de sal, outros metais que podem ser tóxicos para muitos micro-organismos, açúcares ambos fermentáveis e alguma quantidade de açúcar não fermentável.

[0044] As colônias aleatórias mostrando bom crescimento foram selecionadas e testadas quanto à estabilidade e produção de etanol em temperatura alta e finalmente apenas um clone foi selecionado e

nomeado Devleela-1. A linhagem foi identificada como *Saccharomyces cerevisiae* e foi depositada no IDA, *Microbial Cultura Collection*, Pune, Índia e tem um número de acesso MCC 0069.

Tabela 1. Dados comparativos com relação às propriedades de linhagem isolada de *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem selecionada de *Saccharomyces cerevisiae* e linhagem exposta à UV de *Saccharomyces cerevisiae*

	Linhagem isolada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Linhagem selecionada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Linhagem exposta à UV de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Termotolerância	Cultivo em melão até 35° C	Cultivo em melão de até 45° C-47° C	Cultivo em melão de até 45° C-47° C
Osmotolerância	Cultivo até 10% de açúcar fermentável em melão que veio para cerca de 40% de melão	Mais de 20% de açúcar fermentável. Concentração de melão de até 70%	Mais de 20% de açúcar fermentável. Concentração de melão de até 70%
Produção de etanol	~10-13% até 35°C	~14% v/v até 40%. ~10% a 42°C	~16% v/v até 40° C. ~12,8% a 42°C
Reuso de inóculo após fermentação	Eficiência reduzida após um uso	Duas vezes depois disso a eficiência reduz	Cinco vezes sem nenhuma mudança em eficiência

[0045] A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* exposta à UV

produziu mais álcool do que a linhagem naturalmente selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*, com quase zero por cento de açúcar residual e inóculo foi usado cinco vezes sem mudança em eficiência de produção de álcool. Uma vez que ela produziu mais álcool, ela foi também mais tolerante a etanol do que a linhagem naturalmente selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0046] A produção de etanol foi testada em concentrações diferentes de açúcar fermentável em melaço bem como em temperaturas diferentes separadamente. No primeiro conjunto, produção de etanol a partir de concentrações de açúcar fermentável variando de 6% a 15% a 25° C foi testada. Similarmente, produção de etanol foi testada em outras temperaturas, por exemplo, 30° C, 33° C, 35° C, 37° C, 40° C, 44° C e 45° C. Os critérios para a seleção foram produção de etanol máxima em temperatura maior do que 30° C, preferivelmente em tempo mínimo. Produção de etanol também foi testada onde cultura de semente foi preparada através de incubação a 170 rpm, mas após inoculação fermentação foi continuada em condição estática na temperatura requerida.

[0047] Fermentação de etanol foi realizada em melaço diluído em água da torneira em um frasco tendo concentração diferente de açúcares fermentáveis que foi autoclavado por 20 minutos a 120° C. Primeiro semente ou cultura de inicialização foi preparada através de inoculação de cada um dos três clones em concentrações diferentes de melaço separadamente e cultivando por 18-20 horas a 25-37° C. Esta cultura de inicialização ou semente foi usada para inocular o melaço fresco. Os frascos foram incubados nas temperaturas requeridas, em um agitador giratório a 170 rpm e produção de etanol foi testada após período de tempo diferente. Caldo de fermentação integral foi destilado e etanol foi coletado. Neste processo, 50% do volume original puderam ser coletados. A concentração de etanol foi testada através do método

de dicromato de potássio. Açúcar fermentável residual em cada caso foi também testado através do método DNS (ácido di-nitrossalicílico). Dos três clones selecionados para crescimento a 45° C, um dos clones falhou em produzir mais de 12% v/v de etanol mesmo a 30° C, então ele foi descartado. Embora os dois clones tenham produzido mais de 14% de etanol a 30° C, apenas um deles produziu mais de 14% v/v de etanol em temperaturas mais de 30° C e foi selecionado para estudo adicional. A linhagem foi testada adicionalmente através de cultivo em melaço contendo 20,6% de açúcar fermentável a 45° C e para produção de etanol. Após confirmação que a linhagem modificada agora disponível é estável, ela foi chamada Devleela-1.

[0048] Em modalidades da invenção, o método de produção de etanol aperfeiçoado resultou em rendimentos de álcool aumentados que foram obtidos usando levedura modificada *Saccharomyces cerevisiae* como um micro-organismo de produção de etanol no processo de fermentação.

Tolerância a açúcar e etanol

[0049] Em uma das modalidades, a linhagem modificada de levedura mostra crescimento em concentração alta de sacarose contendo outro material seco que está presente no produto de refugo de indústria de cana-de-açúcar que é melaço de cana-de-açúcar bem como no suco de cana de açúcar não purificado e não diluído ou diluído. A sacarose e outros açúcares de redução presentes nesses meios fermentáveis sem nenhuma suplementação ou na presença de uma fonte de nitrogênio na forma de sais inorgânicos ou como sais de amônio ou nitrato, ureia, sais de magnésio e sais de potássio ou fosfatos ou magnésio são utilizados pela linhagem modificada para crescer e ser funcional e converter esses açúcares em etanol. Os açúcares de redução fermentáveis podem variar de 5% a 35% nesses meios, especificamente sacarose. No entanto, a linhagem de levedura

modificada poderia facilmente crescer em concentração de melaço não tratado de 70% tendo açúcar de redução de 45% na faixa de temperatura de 30° C a 45° C. O açúcar de redução pode ser ou monossacarídeos ou dissacarídeos ou qualquer outra forma de açúcar.

[0050] Produção de etanol com fermentação sustentável e alta em temperatura alta resulta em gasto menor uma vez que fermentadores não requerem arrefecimento ou resfriamento e outros meios que estão sendo geralmente usados para manter a viabilidade de levedura durante fermentação. Desta maneira, ela é econômica, ambientalmente amigável e tecnicamente benéfica para uso em uma linhagem termotolerante de levedura em concentração alta de produção de etanol em temperatura alta.

Produção de etanol

[0051] De acordo com a presente invenção, etanol ou álcool etílico é o produto final preferido durante fermentação pela linhagem de levedura modificada do método reivindicado descrito aqui. Nas modalidades preferidas o rendimento de etanol está na faixa de 9% a 21,82% (produção de etanol v/v). Os rendimentos de etanol obtidos a partir do método reivindicado da presente invenção são identificados através de métodos químicos bem como através de análise de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Nas modalidades descritas aqui, rendimento maior de etanol resulta em custos de entrada menores e realização econômica maior a partir de produção de etanol.

[0052] O processo de fermentação de produção de etanol é continuado até que rendimento suficiente de etanol seja produzido. O processo de fermentação pode ser realizado por um período de 20 h a 80 h ou mais. De acordo com a presente invenção, um versado na técnica será capaz de determinar qualquer variável descrita na presente invenção tal como concentração de açúcar em meio de fermentação, duração de fermentação ou temperatura de fermentação para produzir

rendimento desejado de etanol através da utilização da linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0053] A invenção provê um método para produção de etanol e compreende a linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae*, meio contendo açúcares, particularmente em um meio líquido. Cultura da linhagem de levedura modificada é conduzida em uma temperatura que apoia o crescimento e multiplicação da levedura como descrito na presente invenção. Em adição a pelo menos um açúcar, o meio pode também conter mais de um açúcar, pode ou não conter fontes de nitrogênio como sais inorgânicos ou orgânicos ou qualquer outra fonte de nitrogênio, por exemplo, peptona, farinhas de soja, etc, aminoácidos ou outros sais químicos que apoiam o crescimento da linhagem de levedura modificada. Meios adequados incluem, por exemplo, um meio produzido usando cana-de-açúcar que é ou suco de cana-de-açúcar ou melaço obtido em estágios diferentes de processamento durante produção de cana-de-açúcar, com ou sem suplementação com fonte de nitrogênio ou outros sais químicos de apoio de crescimento e multiplicação ou materiais naturais.

[0054] Em uma das modalidades da presente invenção, produção de etanol alta é demonstrada pela pouca quantidade de níveis de açúcar fermentável residual. Nível de açúcar fermentável residual menor é um indicador de taxa e quantidade de produção de etanol. Uma produção de etanol ideal seria uma condição onde açúcar fermentável residual é 0% e produção de etanol é 100%, no entanto, isto não é possível uma vez que alguma quantidade de açúcares será usada para o crescimento, multiplicação e manutenção de micro-organismo.

[0055] Utilização de 100% de açúcares melhora o uso completo de substratos desta maneira diminuindo significativamente o custo de entrada de produção de etanol. A linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae* rende mais etanol e menos açúcares

residuais devido à conversão alta de açúcar em etanol. Em uma modalidade preferida da presente invenção, nível de açúcar residual é menos do que 1%, preferivelmente 0,3% e mais preferivelmente 0,02%. O nível de açúcar residual menor é obtido em temperaturas maiores do que 30° C e preferivelmente maiores do que 35° C ou a 37° C ou a 40° C.

[0056] Em ainda outra modalidade menos ou nenhum estresse durante fermentação, embora mantendo tolerância à açúcar alta, tolerância a etanol alta e tolerância à temperatura alta, foi demonstrado onde foi observado que glicerol não é produzido durante processo de fermentação por linhagem de levedura. Produção de glicerol durante fermentação de etanol é um indicador de estresse onde ao invés de etanol, glicerol é produzido. Linhagem de levedura modificada não produziu nenhum glicerol nas faixas de temperatura descritas na presente invenção.

[0057] As modalidades da presente invenção são novamente definidas nos exemplos não limitantes. Deve ser compreendido que esses exemplos embora indiquem certas modalidades da presente invenção, são providos apenas a título de ilustração. A partir das discussões acima e exemplos dados aqui, qualquer versado na técnica será capaz de determinar as características essenciais da presente invenção e sem se afastar do espírito e escopo da presente invenção pode fazer várias mudanças e modificações nas modalidades da presente invenção para adaptá-la a vários usos e condições.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Método para obtenção de linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae*

[0058] Uma linhagem de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* foi selecionada de um painel de vinte linhagens de levedura isoladas dos

extratos de planta de fermentação, tendo nível alto de matéria seca. Após número significativo de experimentação, é primeira purificação da linhagem de levedura presente nos materiais de planta de fermentação, mantendo cultura pura no laboratório, checagem de seu crescimento em temperatura alta que é a 45° C-47° C através de inoculação das linhagens de levedura em um melaço não tratado contendo mais de 20% de açúcar fermentável, a concentração de melaço pode variar entre 55%-60%. Aqui, o melaço recebido da fábrica é considerado como 100% e diluições foram feitas em água da torneira, misturadas com 1,2% de ágar-ágar, aquecidas para dissolver o ágar-ágar e então plaqueadas em placas de Petri.

[0059] As linhagens de levedura foram diretamente selecionadas quanto ao seu crescimento em concentração diferente de melaço para exemplos de a partir de 10% a 70% de melaço coletado de moinhos de açúcar diferentes em toda a Índia. Concentrações de açúcar fermentável preferivelmente sacarose junto com outro açúcar fermentável no melaço usado aqui variaram de 45% a 60% dependendo da fonte de melaço. A concentração de melaço recebido da fábrica de açúcar foi considerada 100% e foi diluída com água de acordo com a necessidade enquanto também considerando a concentração de açúcares fermentáveis na concentração diluída ou de trabalho de melaço. A linhagem de levedura descrita aqui cresce em concentração de melaço não purificado de 70% que foi diluído em água.

[0060] Todos os vinte isolatos naturais foram cultivados mais em um meio de cultura contendo: extrato de levedura (10 gramas), peptona (10 gramas), dextrose (10 gramas), ágar (10 gramas) como e quando requerido, o meio será conhecido como YPD, água de vidro diluída 1000 mililitros. Diluições seriais de cada um dos isolatos naturais foram preparadas em 1 ml de água estéril, a densidade óptica a 600 nm (nanômetros) foi medida e o número de células/ml nesta densidade

óptica foi contado espalhando-as em placas de YPD. Para selecionar uma linhagem que é mais tolerante a temperatura alta bem como concentração de açúcar em melaço, todos os vinte isolatos foram separadamente suspensos em água destilada estéril para obter um número de célula de 10^6 células/mililitro (ml). Cem microlitros de cada um dos isolatos foram espalhados em placas de melaço onde cada placa tinha um diâmetro de ~9 centímetros. Vinte placas de cada um dos isolatos foram incubadas em ambas 45° C e 47° C, separadamente, até que o crescimento foi visto.

[0061] Dos vinte isolados originalmente selecionados para avaliação, dezessete não mostraram nenhum crescimento a 45° C, então foram descartados. Três isolatos que tinham uma média de 300 colônias crescendo por placas foram usados para investigações adicionais. No entanto, as colônias eram mistura de ambos os tamanhos pequeno e grande, desta maneira, para o próximo conjunto de experimentos todos os tamanhos de colônia pequenos foram descartados. As colônias grandes selecionadas aqui foram plaqueadas adicionalmente em placas de melaço como acima declarado e seu crescimento foi novamente checado. Este processo foi repetido mais cinco vezes (número aleatório) e 10 colônias mostrando bom crescimento de cada um dos três isolados originais foram selecionadas. Cada uma dessas colônias foi suspensa em um ml de meio YPD e espalhada em placas de melaço como acima mencionado para obter colônia única e também checar novamente que elas não eram uma mistura de unidades de formação de colônia pequenas e grandes de células de levedura e são clones estáveis. Neste estágio, dos três isolados selecionados para estudo adicional, dois foram descartados como a colônia única desses dois isolatos produzidos novamente uma mistura de colônias pequenas e grandes, indicando que esses isolatos eram instáveis em processo de seleção rigoroso (temperatura alta e

concentração de açúcar alta de melaço) usado aqui. No presente ajuste experimental, cada colônia se originaria de uma célula de levedura única e os experimentos foram projetados para selecionar um mutante presente na população que fermentaria concentração alta de açúcar para produzir quantidade grande de etanol em temperatura alta. Após novo plaqueamento, três colônias (de agora em diante referidas como clones) que tinham mostrado bom crescimento em ambas 45° C e 47° C em placas de melaço contendo 20% de açúcar fermentável foram selecionadas para estudo adicional. A repetição de estudos de crescimento com esses clones como descrito antes aqui mostrou que todos os três clones produziram colônias de tamanho uniforme que indicou que esses clones eram estáveis em concentração de açúcar alta bem como em temperatura alta. Todos os três clones foram então testados quanto à produção de etanol a partir de melaço sem nenhuma suplementação. Aqui, novamente dois dos clones foram descartados porque a produção de álcool era baixa.

[0062] As linhagens de levedura crescendo em concentrações maiores de melaço que estão em e acima de 20% de melaço foram avaliadas quanto à produção de etanol usando concentração diferente de melaço a 30° C através de método químico (E. A. Crowell e C. S. Ough, *Am. J. Enol. Vitic.* 1979, 30, 1, 61-63). 50 ml de melaço diluído em água da torneira em um frasco de 100 ml tendo concentração diferente de açúcares fermentáveis foram autoclavados por 20 minutos a 120° C. Primeira cultura de semente ou inicialização foi preparada através de inoculação de cada uma das três colônias em concentração diferente de melaço separadamente e cultivando-as por 20 h a 30° C. Esta cultura de inicialização ou semente foi usada para inocular os 50 ml de melaço frescos onde concentração de inóculo final foi 10%. Os frascos foram incubados nas temperaturas requeridas, em um agitador giratório a 170 rpm e produção de etanol foi testada a cada 6,0 horas

até 72 horas de incubação. O total de 50 ml de caldo de fermentação foi destilado e etanol foi coletado. Neste processo, quase 50% de recuperação foram obtidos. A concentração de etano foi testada através do método de dicromato de potássio. Açúcar fermentável residual em cada caso foi também testado pelo método DNS (ácido dinitrossalicílico).

[0063] Finalmente, apenas um clone foi selecionado e 1×10^6 células/ml deste clone foram expostas à luz UV [ultravioleta] 12 ergsmm² por 20 segundos para obter sobrevivência de 1,1% em uma placa de melaço contendo 20% de açúcar fermentável a 45° C. Durante o processo de seleção melaço não purificado foi usado, o qual contém quantidades muito altas de sais, outros metais que podem ser tóxicos para muitos micro-organismos, açúcares ambos fermentáveis e alguma quantidade de açúcar não fermentável.

Exemplo 2

Fermentação de etanol usando melaço

[0064] A linhagem de produção de etanol mais alta selecionada após observação de crescimento em concentração diferente de melaço foi então testada quanto à produção de etanol em temperaturas diferentes variando de 25° C a 44° C. Em um outro experimento produção de metanol foi testada em período de tempo diferente usando temperatura ótima onde produção de álcool foi testada em período de tempo diferente variando após inoculações de 6 h, 12 h, 20 h, 24 h, 36 h, 40 h, 48 h, 54 h, 60 h, 66 h e 72 h até 96 h. A linhagem modificada de *Saccharomyces cerevisiae* produziu rendimento de etanol máximo.

Exemplo 3

Preparação de reagente de dicromato de potássio

[0065] 0,5 grama de dicromato de potássio foi dissolvido em 5 ml de água de vidro destilada e a solução foi mantida em gelo. Depois disso 45 ml de ácido sulfúrico concentrado foram lentamente adicionados com

mistura ocasional do teor. A solução foi continuada a esfriar em gelo por mais ~60 minutos e protegida da luz.

Exemplo 4

Estimativa de etanol

[0066] Um ml de amostra/produto destilado de etanol foi misturado com um ml de reagente de dicromato de potássio e após mistura completa a solução foi posta em um banho de água preajustado a 80° C por 10 minutos. Ele foi então esfriado para a temperatura ambiente e a densidade óptica foi registrada a 575 nm contra um branco de amostra preparado com água pura. A concentração de álcool foi calculada contra uma curva padrão preparada usando etanol absoluto.

Exemplo 5

Estimativa de açúcar fermentável através do método de ácido di-nitrossalicílico

Preparação de reagente di-nitrossalicílico (DNS)

[0067] Em 100 ml de solução de hidróxido de sódio 1% feita em água destilada, 1,0 grama de ácido di-nitrossalicílico, 200 miligramas de fenol cristalino e 50 miligramas de sulfito de sódio foram dissolvidos simultaneamente através de agitação constante. Após todos os ingredientes terem sido dissolvidos, a solução foi armazenada no escuro até o uso. Obter volume de reagente separadamente um pouco antes do uso e adicionar um pouco de sulfito de sódio, misturar bem e usar.

Exemplo 6

Estimativa de açúcar usando reagente DNS

[0068] Melaço foi diluído para a concentração requerida e um ml de amostra foi misturado com um ml de reagente DNS e aquecido em um banho de água fervente por 15 minutos. Após esfriar para a temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida a 510 nm contra branco de amostra preparado usando água. A concentração de açúcar foi calculada usando uma curva padrão que foi preparada usando dextrose.

Exemplo 7

Níveis de açúcares fermentáveis residuais

[0069] Linhagem de levedura modificada mostrou pouco açúcar fermentável residual e produção de etanol alta como julgado pelos métodos DNS (Miller, 1959, *Analytical Chemistry*, 31, 426-428).

[0070] Nível de açúcar residual foi menos do que 1% uma indicativa de alta conversão de açúcar fermentável ou reduzido em etanol. Análise de HPLC mostrou alguns picos menores que são menos do que 1% do pico obtido para etanol, indicando que quase todo o açúcar fermentável converteu em etanol. Açúcar residual era ou mais baixo que é 0,02% a 37°C e ligeiramente mais a 35°C e 40°C que é média 0,21%. Ainda, após término de fermentação o nível de açúcar residual não era detectável através do método usado na presente invenção.

[0071] Embora a presente invenção descreva a produção de etanol a partir de melaço de cana-de-açúcar e suco de cana-de-açúcar, qualquer outro açúcar fermentável tais como extratos de planta ou sucos de fruta contendo alto teor de açúcar, etc, será igualmente bom e seria possível que qualquer um versado na técnica fizesse várias modificações nos métodos descritos aqui como exemplo e atingisse resultados similares. Tais modificações e mudanças das fontes de açúcar pretendem também se encaixar no escopo e espírito das reivindicações apensas.

Tabela 2. Concentração de açúcar residual após fermentação a 37° C

No. Sr.	Tempo de fermentação	Concentração de açúcar total
1	0 hora	10,1%
2	12 horas	3,65%
3	24 horas	0,95%
4	36 horas	0,02%
5	48 horas	Não detectável

[0072] O açúcar total de melaço foi estimado após tempo de

fermentação requerido usando método DNS padrão.

Exemplo 8

Produção de etanol pela linhagem de levedura isolada não modificada usando melaço de cana-de-açúcar como substrato

a) Produção de etanol pela linhagem de levedura "isolada não modificada" a 30°C

[0073] Cultura de semente foi preparada em melaço 20% por 20 h a 30° C e 170 rpm. Após inoculação os frascos foram removidos em pontos de tempo diferentes e a concentração de etanol foi medida através do método de dicromato.

Tabela 3. Produção de etanol pela linhagem de levedura "isolada não modificada" a 30°C

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	6	3,12
2	8	3,45
3	10	4,68
4	12	6,68
5	24	8,25
6	48	10,24

b) Produção de etanol pela linhagem de levedura "isolada não modificada" a 37°C

[0074] Cultura de semente foi preparada em melaço 20% por 20 h a 30°C e 170 rpm. Após inoculação, os frascos foram removidos em pontos de tempo diferentes e concentração de etanol foi mediada através do método de dicromato.

Tabela 4. Produção de etanol pela linhagem de levedura "isolada não modificada" a 37°C

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	6	6,86
2	8	7,52
3	10	8,25
4	12	10,0
5	24	12,75
6	48	13,06
7	54	13,06
8	72	13,06

c) Produção de etanol pela linhagem de levedura "isolada não modificada" a 42°C

[0075] Crescimento de linhagem de levedura isolada não modificada foi relativamente pobre a 42°C.

Exemplo 9

Produção de etanol pela linhagem de levedura modificada usando melaço de cana-de-açúcar como substrato

a) Produção de etanol pela linhagem modificada de *Saccharomyces cerevisiae*

[0076] Melaço foi coletado de fábrica de açúcar local e açúcar total foi estimado através de método DNS padrão. Frascos de 100 ml contendo 50 ml de melaço diluído (de acordo com a concentração de açúcar presente no melaço da fábrica) em água da torneira, pH 4,5-5,2, foram esterilizados através de autoclave. Cada frasco foi inoculado usando cultura de semente 10% de 20 h (preparada na concentração de melaço a ser usada para fermentação de 10% como concentração final de inóculo) e foi incubado a 30° C a 170 rpm. Dois frascos foram removidos após cada tempo de incubação; etanol foi destilado e sua concentração foi estimada usando método de dicromato de potássio.

Tabela 5. Porcentagem de etanol em melaço de cana-de-açúcar 20% a 30°C & 170 rpm

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	6	2,88
2	8	4,2
3	10	6,2
4	12	7,0
5	24	10,2
6	30	15,36
7	36	15,36
8	48	15,37

b) Produção de etanol pela linhagem modificada de *Saccharomyces cerevisiae*

[0077] Melaço foi coletado de fábrica de açúcar local e açúcar total foi estimado através de métodos DNS padrão. Frascos de 100 ml contendo 50 ml de melaço diluído (de acordo com a concentração de açúcar presente no melaço da fábrica) em água da torneira, pH 4,5-5,2, foram esterilizados através de autoclave. Cada frasco foi inoculado usando cultura de semente 10% de 20 h (preparada na concentração de melaço a ser usado na fermentação, 10% como concentração final de inóculo) e foi incubado a 37° C a 170 rpm. Dois frascos foram removidos após cada tempo de incubação; etanol foi destilado e sua concentração foi estimada usando método de dicromato de potássio.

Tabela 6. Porcentagem de etanol em melaço de cana-de-açúcar 20% a 37°C & 170 rpm

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	24	9,5
2	30	11,84
3	36	12,58
4	48	13,2
5	54	13,6
6	72	17,94

c) Produção de etanol pela linhagem modificada de *Saccharomyces*

cerevisiae

[0078] Melaço foi coletado de fábrica de açúcar local e açúcar total foi estimado através de método de DNS padrão. Frascos de 100 ml contendo 50 ml de melaço diluído (de acordo com a concentração de açúcar presente no melaço da fábrica) em água da torneira, pH 4,5-5,2, foram esterilizados através de autoclave. Cada frasco foi inoculado usando cultura de semente 10% 20 h e (preparada na concentração de melaço a ser usado para fermentação, 10% como concentração de inóculo final) e foi incubado a 42° C a 170 rpm. Dois frascos foram removidos após cada tempo de incubação; etanol foi destilado e sua concentração foi estimada usando método de dicromato de potássio.

Tabela 7. Porcentagem de etanol em melaço de cana-de-açúcar 20% a 42° C & 170 rpm

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	24	7,5
2	48	10,8
3	72	11,44

Exemplo 10

Produção de etanol por linhagem de levedura modificada usando suco de cana-de-açúcar como substrato

[0079] a) Produção de etanol usando suco de cana-de-açúcar a 30° C pela linhagem modificada por UV de levedura na presença de sulfato de amônio 0,5%. Semente foi preparada a 30°C por 20 h a 170 rpm e então usada para inoculação para fermentação. Os frascos foram incubados a 30°C, a 170 rpm, removidos em pontos de tempo diferentes como indicado na tabela abaixo e concentração de álcool foi mediada através do método de dicromato.

Tabela 8. Porcentagem de etanol em suco de cana-de-açúcar a 30°C & 170 rpm

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	12	8,97
2	20	10,5
3	24	12,16
4	30	13,2
5	36	14,76
6	48	15,13

[0080] b) Suco de cana-de-açúcar foi comprado de um vendedor local e foi diluído para 20% em água da torneira e sulfato de amônio 0,5% (concentração final) foi adicionado a isto. Sulfato de amônio foi adicionado como uma fonte de nitrogênio para apoiar crescimento de levedura. Semente foi preparada a 30°C por 20 h a 170 rpm e então usada para inoculação para fermentação. Os frascos foram incubados a 37°C, a 170 rpm, removidos em pontos de tempo diferentes como indicado na tabela abaixo e concentração de álcool foi medida através do método de dicromato.

Tabela 9. Porcentagem de etanol em suco de cana-de-açúcar a 37° C & 170 rpm

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	6	7,56
2	12	12,8
3	20	15,6
4	24	19,24
5	30	21,08
6	36	21,80
7	48	21,82

[0081] c) Produção de etanol usando suco de cana-de-açúcar a 42°C pela linhagem modificada por UV de levedura na presença de sulfato de amônio 0,5%. Semente foi preparada a 30°C por 20 h a 170

rpm e então usada para inoculação para fermentação. Os frascos foram incubados a 42°C a 170 rpm, removidos em pontos de tempo diferentes como indicado na tabela abaixo e concentração de álcool foi medida através do método de dicromato

Tabela 10. Porcentagem de etanol em suco de cana-de-açúcar a 42° C & 170 rpm

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	12	5,44
2	20	7,4
3	24	8,2
4	30	9,1
5	36	9,1
6	48	10,12

Exemplo 11

Produção de etanol a partir da linhagem de levedura modificada usando arroz como substrato

[0082] a) Produção de etanol usando arroz como substrato: 100 g foram tratados com 120.00U de α -amilase, 85-90° C, 12 horas seguido por 250,00U de glicoamilase 55-60° C, 12 h. A mistura foi então suplementada com sulfato de magnésio (40 mg/100 ml), cloreto de amônio (80 mg/100 ml), hidrogeno fosfato de potássio (140 mg/100 ml), extrato de levedura (40 mg/100 ml). A semente foi preparada a 30° C, 170 rpm por 18 horas. Fermentação foi conduzida a 30° C, 170 rpm.

Tabela 11. Produção de etanol a 30° C usando arroz como substrato

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	11	2,8
2	20	8,2
3	24	10,7
4	36	11,2
5	48	12,08

[0083] b) Produção de etanol usando arroz como substrato: 100 g de arroz foram tratados com 120,00U de α -amilase, 85-90° C, 14 horas seguido por 250,00U de glicoamilase a 55-60° C por 11 h. A mistura foi então suplementada com sulfato de magnésio (40 mg/100 ml), cloreto de amônio (80 mg/100 ml), hidrogeno fosfato de potássio (140 mg, 100 ml) e extrato de levedura (40 mg/100 ml). Semente foi preparada a 30° C, 170 rpm por 18 horas. Fermentação foi conduzida a 37° C, 170 rpm. A concentração de etanol foi testada através do método de dicromato de potássio. Açúcar fermentável residual em cada caso foi também testado através do método DNS (ácido di-nitrossalicílico).

Tabela 12. Produção de etanol a 37° C usando arroz como substrato

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	11	8,0
2	20	13,3
3	24	14,8
4	36	14,7
5	48	16,6

c) Produção de etanol usando arroz como substrato:

[0084] 100 g foram tratados com 120,00U de α -amilase, 85-90°C, 12 horas seguido por 250,00U de glicoamilase 55-60° C, 12 h. A mistura foi então suplementada com sulfato de magnésio (40 mg/100 ml), cloreto de amônio (80 mg/100 ml), di-hidrogeno fosfato de potássio (140 mg/100 ml), extrato de levedura (40 mg/100 ml). Semente foi preparada a 30°C, 170 rpm por 18 horas. Fermentação foi conduzida a 40° C, 170 rpm. Concentração de etanol foi testada através do método de dicromato de potássio. Açúcar fermentável residual em cada caso foi também testado através do método DNS (ácido di-nitrossalicílico).

Tabela 13. Produção de etanol a 40° C usando arroz como substrato

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	11	2,8
2	19	11,2
3	24	14,7
4	35	14,4
5	43	14,08

[0085] d) Produção de etanol usando arroz como substrato: 100 g de arroz foram tratados com 120,00U de α -amilase, 85-90° C, 12 horas, seguido por 250,00U de glicoamilase 55-60° C, 12 h. A mistura foi então suplementada com sulfato de magnésio (40 mg/100 ml), cloreto de amônio (80 mg/100 ml), di-hidrogeno fosfato de potássio (140 mg/100 ml), extrato de levedura (40 mg/100 ml). Semente foi preparada a 130° C, 170 rpm por 18 horas. Fermentação foi conduzida a 42° C, 170 rpm. Concentração de etanol foi testada através de método de dicromato de potássio. Açúcar de fermentação residual em cada caso foi também testado através do método DNS (ácido di-nitrossalicílico).

Tabela 14. Produção de etanol a 42° C usando arroz como substrato

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	11	4,92
2	20	9,1
3	24	10,01
4	35	10,75
5	44	9,7
6	48	8,6

Exemplo 12

Produção de etanol pela linhagem de levedura modificada usando bajra como substrato

[0086] Produção de etanol usando bajra como substrato após

tratamento com α -amilase 1200U a 85-90°C, 3 h, seguido por glicoamilase 25000U 55-60°C, 3 h. A mistura foi então suplementada com sulfato de magnésio (7 mg/100 ml), cloreto de amônio (100 mg/100 ml), di-hidrogeno fosfato de potássio (50 mg/100 ml). Semente foi preparada a 30°C, 170 rpm por 18 h e fermentação foi feita a 37°C, 170 rpm. Concentração de etanol foi testada através do método de dicromato de potássio. Açúcar fermentável residual em cada caso foi também testado através do método de DNS (ácido di-nitrossalicílico).

Tabela 15. Produção de etanol a 37°C usando bajra como substrato

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	22	6,1
2	48	5,7
3	72	5,2

Exemplo 13

Produção de etanol pela linhagem de levedura modificada usando milho como substrato

[0087] Produção de etanol usando milho após tratamento com 1200U de α -amilase a 85-90°C por 5 h seguido por 200,00U de glicoamilase a 55-60°C por 18 h (ambos graus comerciais). Semente foi preparada usando os respectivos substratos por 18 h a 30°C, 170 rpm. Fermentação foi conduzida a 37°C, 170 rpm. Concentração de etanol foi testada através do método de dicromato de potássio. Açúcar fermentável residual em cada caso foi também testado através do método DNS (ácido di-nitrossalicílico).

Tabela 16. Produção de etanol a 37° C usando amido de milho como substrato

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	24	6,3
2	48	6,0
3	72	4,4

Exemplo 14

Produção de etanol pela linhagem de levedura modificada usando polpa de tronco de banana como substrato

[0088] Produção de etanol usando polpa de tronco de banana (substrato lignocelulósico) como substrato. A polpa foi suplementada com cloreto de amônio (50 mg/100 ml), di-hidrogeno fosfato de potássio (80 mg/100 ml) e sulfato de magnésio (20 mg/100 ml), extrato de levedura (10 mg/100 ml), cloreto de cálcio (10 mg/100 ml). Semente foi preparado na polpa a 30°C, 170 rpm por 18 h. Fermentação foi conduzida a 37°C, 170 rpm. Concentração de etanol foi testada através do método de dicromato de potássio. Açúcar fermentável residual em cada caso foi também testado através do método DNS (ácido dinitrossalicílico).

Tabela 17. Produção de etanol a 37°C usando polpa de tronco de banana como substrato

No. Sr.	Tempo de incubação (em h)	Porcentagem de etanol (%)
1	24	0,8
2	72	2,4

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[0089] 1. Linhagem de levedura modificada tendo propriedades de osmotolerância, tolerância a etanol, termotolerância e autofloculação.

[0090] 2. Produção de etanol alta usando linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em temperatura alta, concentração de açúcar alta e concentração de etanol alta resulta em custo significativamente menor de entrada, processamento a jusante aperfeiçoado e redução em quantidade de afluente, desta maneira reduzindo o custo de tratamento de afluente.

REIVINDICAÇÕES

1. Linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae* caracterizada por ter número de acesso MCC 0069, em que a linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae* tendo número de acesso MCC 0069 foi modificada por exposição à luz ultravioleta e apresenta termotolerância, tolerância a etanol, autofloculação e osmotolerância.

2. Linhagem de levedura modificada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita levedura produz etanol em faixa de temperatura de 25°C a 44°C.

3. Linhagem de levedura modificada de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a dita levedura produz etanol em faixa de temperatura de 37°C a 42°C.

4. Linhagem de levedura modificada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita levedura produz etanol na faixa de 12,08% a 21,82% [v/v] usando um substrato selecionado do grupo consistindo em suco de cana-de-açúcar, melão de cana-de-açúcar e arroz em uma faixa de temperatura de 30 a 42°C para período de tempo de incubação na faixa de 30 a 72 horas.

5. Linhagem de levedura modificada de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a dita levedura produz etanol na faixa de 12,08% a 15,36% [v/v] usando um substrato selecionado do grupo consistindo em suco de cana-de-açúcar, melão de cana-de-açúcar e arroz em uma temperatura de 30°C para período de tempo de incubação na faixa de 30 a 48 horas.

6. Linhagem de levedura modificada de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a dita levedura produz etanol na faixa de 16,6% a 21,82% [v/v] usando um substrato selecionado do grupo consistindo em suco de cana-de-açúcar, melão de cana-de-açúcar e arroz em uma temperatura de 37°C para período de tempo de incubação na faixa de 48 a 72 horas.

7. Linhagem de levedura modificada de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o melão de cana-de-açúcar usado para o

cultivo da dita levedura está em uma concentração na faixa de 10% a 70% e a quantidade de concentração de açúcar fermentável no dito melaço está na faixa de 45% a 60%.

8. Linhagem de levedura modificada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita levedura produz quantidade grande de etanol em nível de açúcar residual de menos de 1% em temperaturas maiores do que 30°C.

9. Linhagem de levedura modificada de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a dita levedura produz quantidade grande de etanol em nível de açúcar residual de 0,3% em temperaturas maiores do que 35° C.

10. Linhagem de levedura modificada de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a dita levedura produz quantidade grande de etanol em nível de açúcar residual de 0,02% em temperaturas maiores ou iguais a 37° C.

11. Método para obtenção da linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae* tendo número de acesso MCC 0069, como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- (a) submeter a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* a uma faixa de temperatura de 45° C a 47° C e em concentração de açúcar fermentável de 20% para obter a linhagem selecionada; e
- (b) tratar a dita linhagem selecionada com luz ultravioleta a 12 ergs/mm² por 20 segundos para obter 1,1% de sobrevivência em uma placa de melaço contendo 20% de açúcar fermentável a 45°C para obter a linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae* tendo número de acesso MCC 0069.

12. Método para produção de etanol usando a linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae* tendo número de acesso MCC 0069, como definida na reivindicação 1, a dita linhagem tendo termotolerância, tolerância a etanol, autofloculação e osmotolerância, caracterizado pelo fato de

que compreende as etapas de:

- (a) inocular a dita linhagem de levedura modificada de *Saccharomyces cerevisiae* tendo número de acesso MCC 0069 em um substrato selecionado do grupo consistindo em melaço de cana-de-açúcar, suco de cana-de-açúcar, extrato de planta, suco de fruta contendo alto teor de açúcar, bajra, amido de milho e polpa de tronco de banana para obter uma cultura de levedura;
- (b) incubar a dita cultura de levedura por 6 a 96 horas em uma faixa de temperatura de 25 a 45°C a 150 a 170 rpm; e
- (c) obter etanol através da dita cultura de levedura após 24 horas de incubação.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a temperatura para o cultivo da dita levedura está na faixa de 35°C a 40°C.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que quantidade de etanol produzida pela dita levedura está na faixa de 12,08% a 21,82% [v/v] usando um substrato selecionado do grupo consistindo em suco de cana-de-açúcar, melaço de cana-de-açúcar e arroz em uma faixa de temperatura de 30 a 42° C por período de tempo de incubação na faixa de 30 a 72 horas.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que quantidade de etanol produzido pela dita levedura está na faixa de 12,08% a 15,36% [v/v] usando um substrato selecionado do grupo consistindo em cana-de-açúcar, melaço de cana-de-açúcar e arroz em uma temperatura de 30°C por um período de tempo na faixa de 30 a 48 horas.

16. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que quantidade de etanol produzido pela dita levedura está na faixa de 16,6% a 21,82% [v/v] usando um substrato selecionado do grupo consistindo em suco de cana-de-açúcar, melaço de cana-de-açúcar e arroz em uma temperatura de 37°C por um período de tempo de 48 a 72 horas.

17. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o melaço de cana-de-açúcar usado para o cultivo da dita levedura é usado em uma concentração na faixa de 10% a 70% e a quantidade de concentração de açúcar fermentável no dito melaço é de 45% a 60%.

18. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o etanol obtido é usado como biocombustível, solvente, etanol potável e para aplicação industrial.

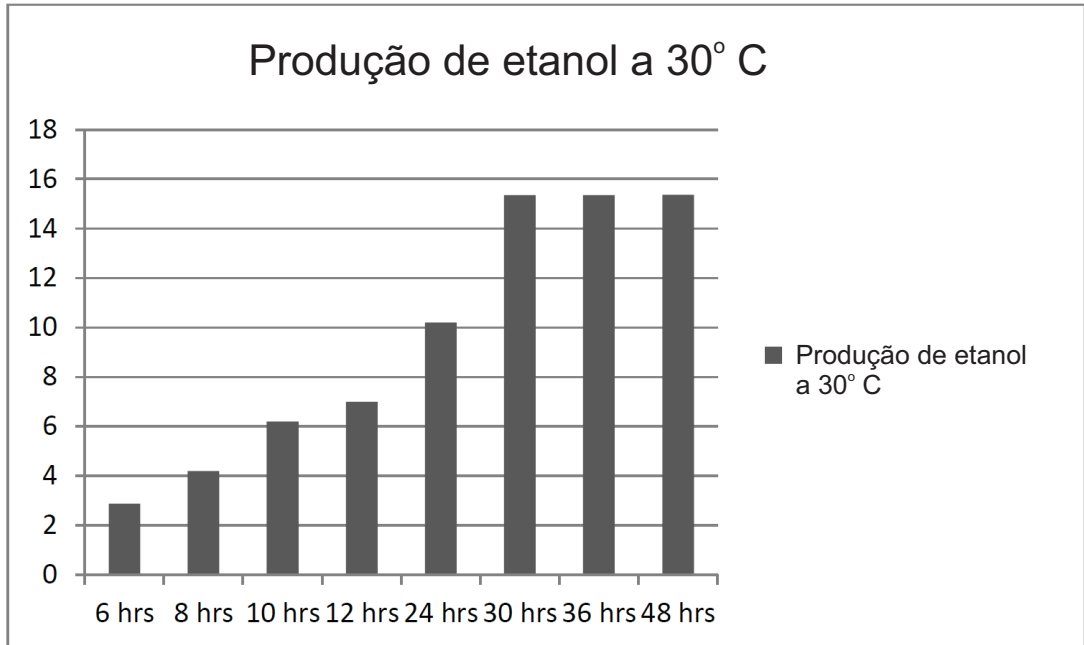


FIG. 1

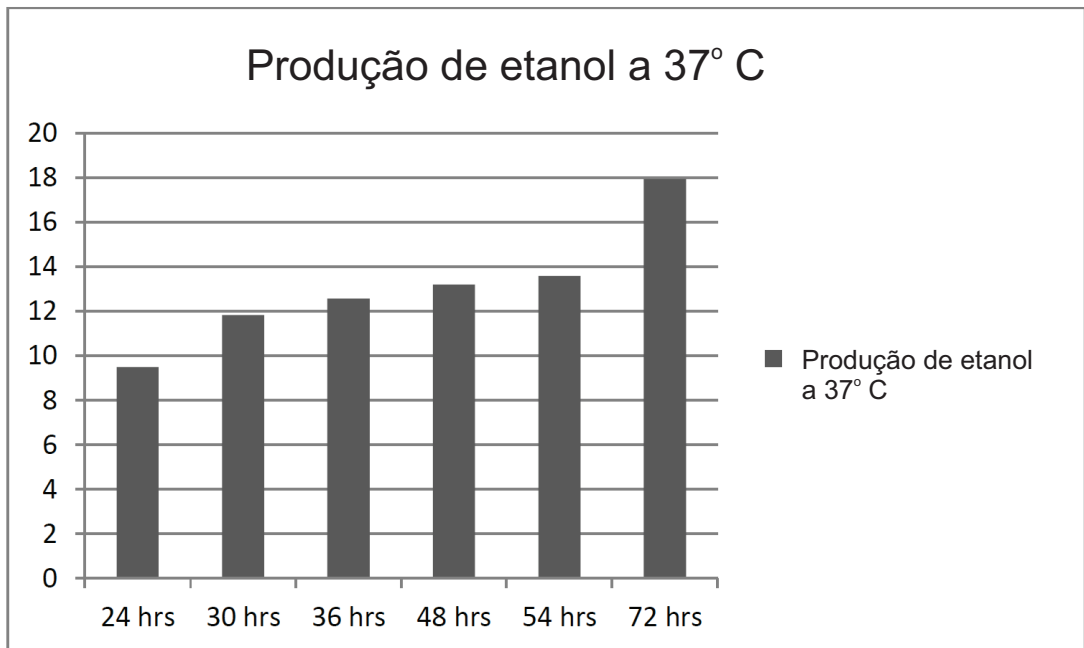


FIG. 2

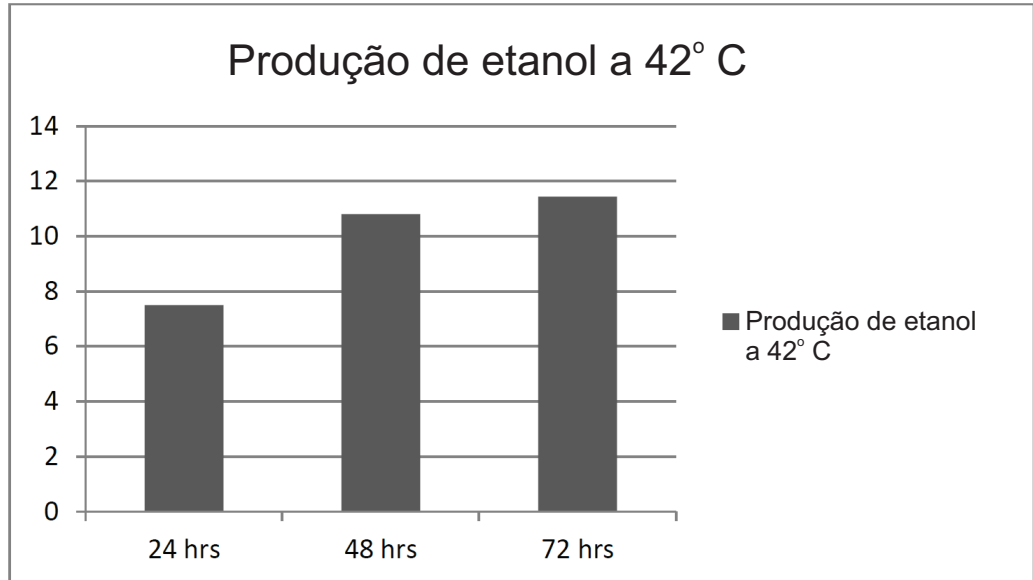


FIG. 3

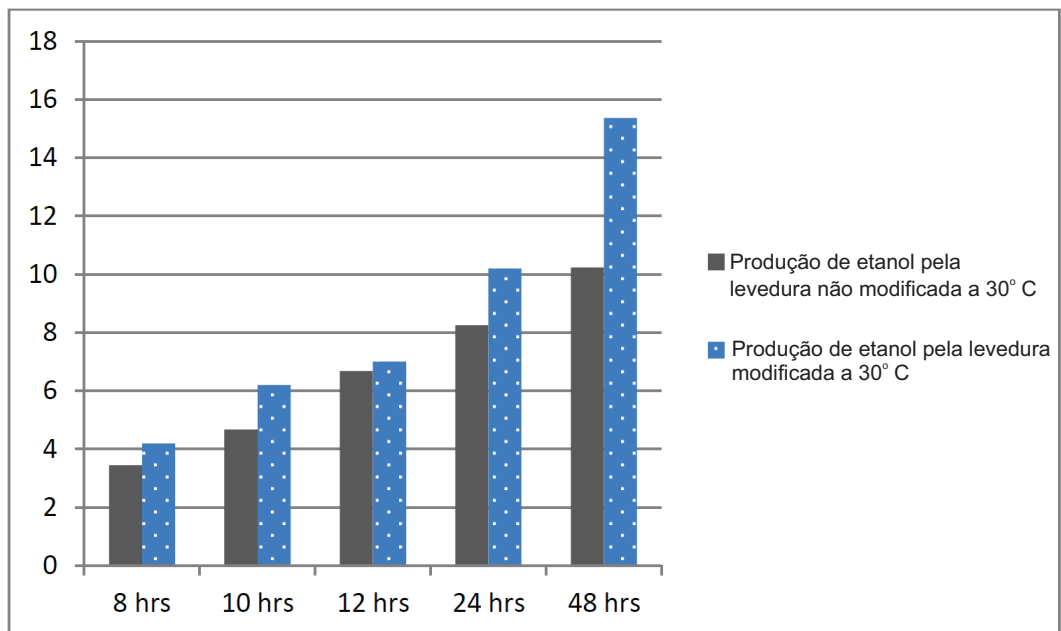


FIG. 4

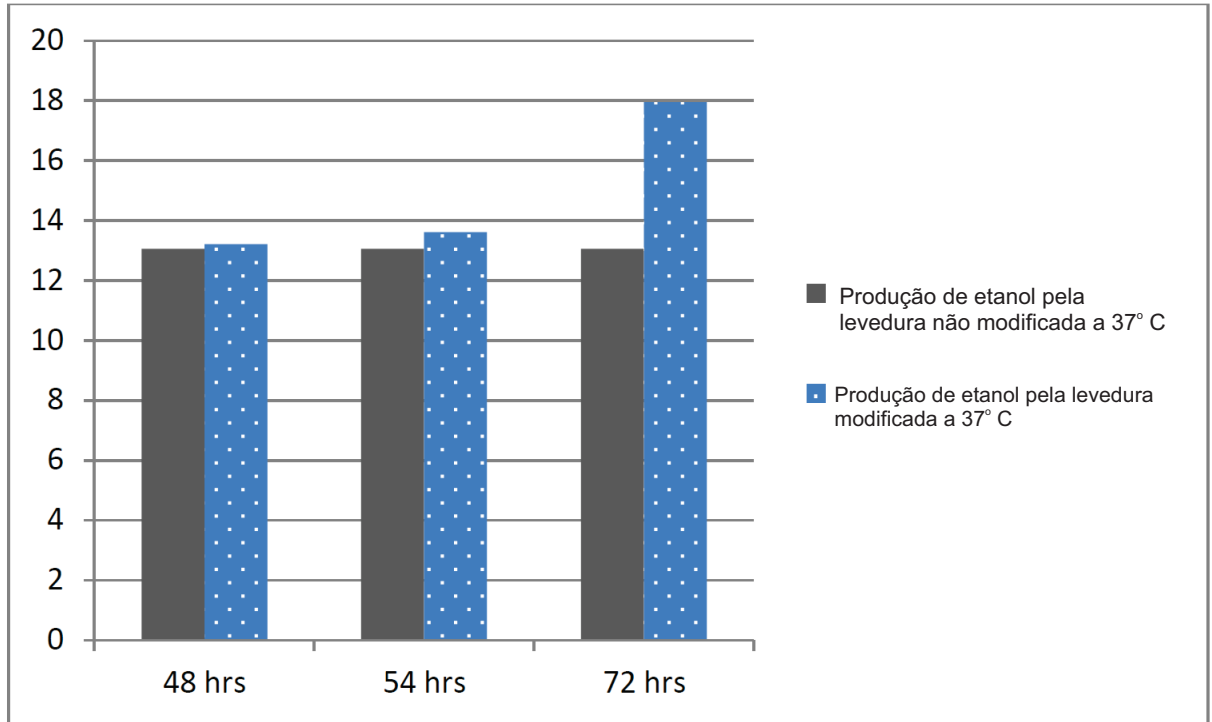


FIG. 5

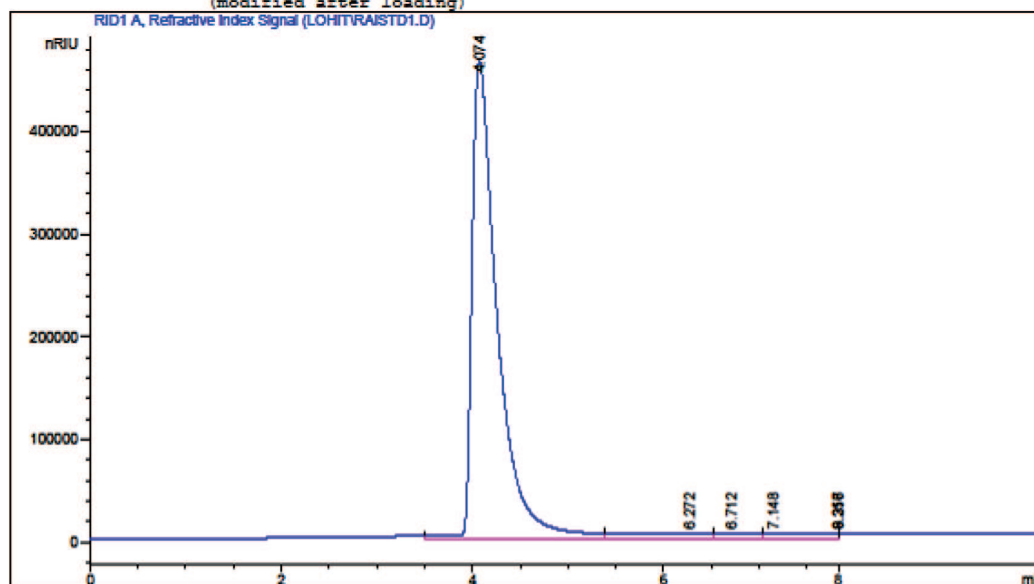
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\LOHIT\RAISTD1.D

Sample Name: RAISTD1

```

=====
Injection Date   : 1/1/2002 4:34:55 AM
Sample Name     : RAISTD1                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : IIT KGP
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEF.LC.M
Last changed   : 1/1/2002 4:09:01 AM by IIT KGP
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Area %
1	4.074	EV	0.2722	8.73244e6	4.66982e5	82.7624
2	6.272	VV	0.8555	4.44461e5	6780.43164	4.2124
3	6.712	VV	0.3959	2.07190e5	6771.45752	1.9637
4	7.148	VV	0.7685	4.34669e5	6712.25244	4.1196
5	8.257	VV	0.6251	3.42436e5	6572.56250	3.2455
6	9.216	VBA	0.7817	3.90018e5	6647.20166	3.6964

```
Totals :                      1.05512e7  5.00465e5
```

```
Results obtained with enhanced integrator!
```

```
*** End of Report ***
```

(A) Perfil de HPLC mostra que produção de etanol durante fermentação de melão de cana-de-açúcar é quase livre de qualquer contaminação

FIG. 6

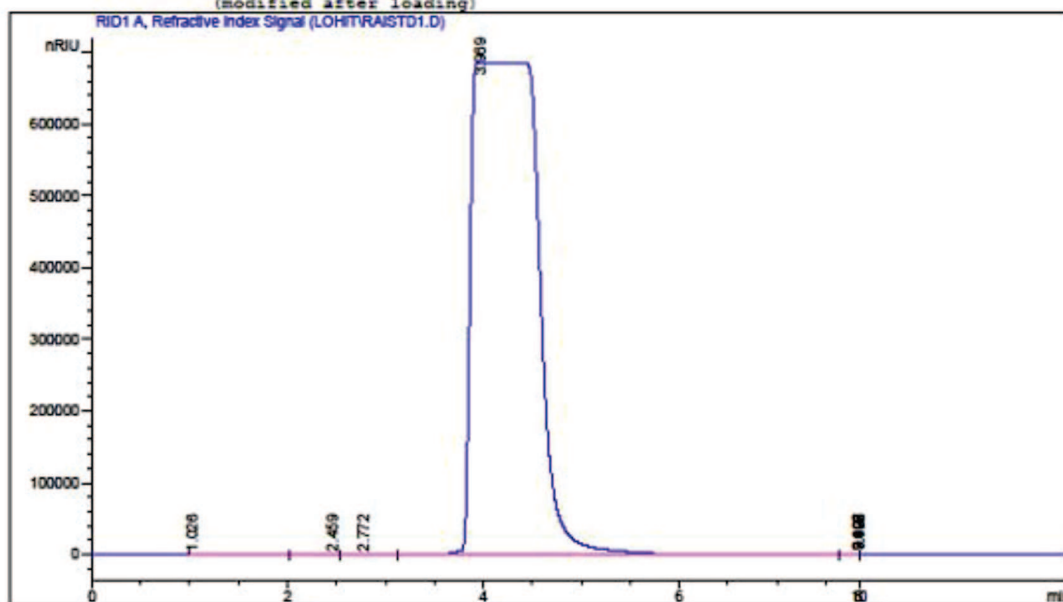
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\LOHIT\RAISTD1.D

Sample Name: RAISTD1

```

=====
Injection Date   : 1/1/2002 4:09:42 AM
Sample Name     : RAISTD1                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : IIT KGP
Method          : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEF_LC.M
Last changed    : 1/1/2002 4:09:01 AM by IIT KGP
                  (modified after loading)
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By       : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 20.000000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Area %
1	1.026	BP	0.7938	481.19724	7.13085	1.518e-3
2	2.459	VV	0.2182	839.52784	50.92608	2.648e-3
3	2.772	VV	0.2988	2508.92505	114.51443	7.913e-3
4	3.969	VV	0.5726	3.16601e7	6.86447e5	99.8586
5	7.902	VV	0.5360	1.60793e4	366.20688	0.0507
6	9.126	VV	0.5321	1.76816e4	416.45477	0.0558
7	9.497	VV	0.2088	7228.02783	416.69910	0.0228

```
Totals :                3.17049e7  6.87819e5
```

```
Results obtained with enhanced integrator!
```

```
*** End of Report ***
```

(B)Perfil de HPLC de etanol puro

FIG. 6