



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

(21) **PI1000543-9 A2**

(22) Data de Depósito: 05/03/2010
(43) Data da Publicação: 25/10/2011
(RPI 2129)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 1/02

(54) Título: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO A PARTIR DE UM HIDROLISATO DE AÇÚCAR

(73) Titular(es): Iogen Energy Corporation

(72) Inventor(es): Gary M. Pigeau, Jan-Maarten Geertman

(57) Resumo: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO A PARTIR DE UM HIDROLISATO DE AÇÚCAR. A presente invenção refere-se a um método para produção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar. O método compreende fermentação do hidrolisato de açúcar em um sistema de fermentação com levedura para produzir um caldo de fermentação compreendendo um produto de fermentação; introdução de ácido e um oxidante, tal como dióxido de cloro, ao sistema de fermentação de modo a expor contaminantes microbiais no sistema de fermentação em um ou mais estágios a dióxido de cloro e um pH menor do que 3,0; e recuperação do produto de fermentação. Em um exemplo da invenção, uma pasta fluida de levedura obtida de uma etapa de reciclo de levedura é tratada com ácido e o oxidante.



PI1000543-9

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO A PARTIR DE UM HIDROLISATO DE AÇÚCAR".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a um método para a produção de um produto de fermentação. Mais especificamente, a presente invenção se refere a um método para a produção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar.

Antecedentes da Invenção

10 Estoque de alimentação lignocelulósico é um termo comumente usado para descrever biomassa derivada de planta compreendendo celulose, hemicelulose e lignina. Muita atenção e esforço têm sido aplicados nos anos recentes para a produção de combustíveis e químicos, principalmente etanol, de estoques de alimentação lignocelulósicos, tais como despejos agrícolas e despejos de floresta, devido a seu baixo custo e ampla disponibilidade. Estes despejos agrícolas e de floresta são tipicamente queimados ou enterrados; desse modo usando-se estes estoques de alimentação lignocelulósicos de produção de etanol oferece uma alternativa atrativa para disponibilidade. Ainda outra vantagem destes estoques de alimentação é que o subproduto lignina, que permanece após o processo de produção de celulose, pode ser usado como um combustível para energizar o processo ao invés de combustíveis fósseis. Vários estudos têm concluído que, quando a produção total e ciclo de consumo é levado em conta, a produção de etanol dos estoques de alimentação lignocelulósicos gera gases de estufa perto de zero.

15

20

25

 A primeira etapa de processamento químico para conversão de estoque de alimentação lignocelulósico em etanol, ou outros produtos de fermentação, envolve quebra do material lignocelulósico fibroso para liberar monômeros de açúcar a partir do estoque de alimentação para conversão em um produto de fermentação em uma etapa subsequente de fermentação.

30

 Existem vários métodos conhecidos para produção de açúcares fermentáveis de estoques de alimentação lignocelulósicos, um dos quais

envolve um pré-tratamento com ácido ou álcali, seguido por hidrólise de celulose com enzimas celulase e β -glucosidase. A proposta do pré-tratamento é aumentar a área superficial da celulose e converter o estoque de alimentação fibroso em uma textura turva, com conversão limitada da celulose em glicose. O pré-tratamento com ácido tipicamente hidrolisa o componente de hemicelulose do estoque de alimentação para produzir xilose, glicose, galactose, manose e arabinose e isto é pensado aperfeiçoar a acessibilidade da celulose em enzimas celulase. As enzimas celulase hidrolisam celulose em celobiose que é então hidrolisada em glicose por β -glucosidase. A hidrólise da celulose e hemicelulose pode ser alcançada com um tratamento químico de etapa simples em que o estoque de alimentação lignocelulósico é contactado com um ácido forte ou álcali sob condições suficientes para hidrolisar ambos os componentes de celulose e hemicelulose do estoque de alimentação em monômeros de açúcar.

Após produção de uma corrente compreendendo açúcar fermentável a partir do estoque de alimentação lignocelulósico, uma separação de sólidos pode ser conduzida para remover lignina, seguida por fermentação dos açúcares em etanol ou outros produtos de fermentação. Se glicose é o substrato predominante presente, a fermentação é tipicamente efetuada com uma levedura de sp. *Saccharomyces spp.* que converte este açúcar e outros açúcares hexose presentes em etanol. Contudo, glicose pode também ser fermentada a outros produtos comerciais incluindo ácido láctico, sorbitol, ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico, propanodiol, butanodiol, xilitol, acetona, e butanol. Esta conversão pode ser efetuada por uma variedade de organismos, incluindo sp. *Saccharomyces*.

Os açúcares pentose, xilose e arabinose, que ocorrem a partir do componente hemicelulose do estoque de alimentação durante pré-tratamento ácido, podem ser fermentados em etanol. Contudo, uma vasta maioria de cepas *Saccharomyces* tipo selvagens não contêm naturalmente todos os genes requeridos para conversão destes açúcares em etanol. Desse modo, eles devem ser introduzidos na levedura para permitir esta conversão. Leveduras recombinantes que são capazes de converter xilose em eta-

nol são descritas, por exemplo, nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.789.210 e 6.475.768 e EP 1 727 890.

Um problema com a fermentação de açúcar em etanol ou outros produtos de fermentação é que bactéria pode se propagar rapidamente, visto que as condições ótimas da fermentação são também conducentes a seu crescimento. Subprodutos indesejados que podem ser produzidos por contaminantes bacteriais durante fermentação incluem ácido láctico, acetona, ácido propiônico e micotoxins. Ácido láctico é um subproduto comum produzido por bactérias tais como sp. *Lactobacillus*, sp. *Pediococcus*, sp. *Leuconostoc* e/ou sp. *Weissella* (entre outras) durante fermentações de etanol. A produção de tais subprodutos indesejáveis diminui a produção do produto de fermentação desejado à medida que a bactéria compete com a levedura para açúcares fermentáveis e os converte em subprodutos indesejáveis ao invés do produto de fermentação de interesse. Além disso, ácidos orgânicos e outros subprodutos podem ser inibitórios à levedura. Cada um destes fatores pode contribuir para diminuir a eficiência da fermentação pelo aumento do tempo requerido para efetuar a fermentação, aumentando a quantidade de levedura requerida e/ou diminuindo os rendimentos finais para o produto de fermentação desejado a partir de açúcares fermentáveis.

A contaminação microbiana é especialmente problemática quando a concentração de levedura no fermentador é aumentada por reciclo de levedura. O reciclo de levedura é empregado para aperfeiçoar a eficiência de processos de fermentação que são submetidos a cinéticas de reação lentas relativas a glicose tais como aquelas envolvendo a conversão de xilose em etanol ou quando ela é benéfica para aumentar taxas de conversão volumétricas. O aumento na taxa volumétrica de conversão de açúcar fermentável em etanol pode ser alcançado por separação continuamente da levedura a partir do caldo de fermentação coletado, tal como por centrifugação, e em seguida recirculação da levedura de volta para o fermentador. Por reintrodução da levedura no reator dessa maneira, a concentração de levedura no fermentador é continuamente mantida em um alto nível, sem desvio significativo de açúcares para crescimento de célula e para fora do produto de fer-

mentação desejado. Contudo, como um resultado de recirculação repetida de levedura, micróbios indesejados, tais como bactérias, são também reciclados junto com a levedura. Como as bactérias tendem a se dividirem mais rapidamente do que a levedura, isto pode conduzir a níveis significantes de contaminação microbial.

de Oliva-Neto e Yokoya (Brazilian Journal of Microbiology, 2001, 3:10-14) examinaram o efeito de uma variedade de compostos antimicrobiais na viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* nas fermentações efetuadas em suco de cana para produzir etanol. Isto inclui químicos formulados, tais como zinco manganês etilenebis (ditiocarbamato), metilditiocarbamato, 3-metil-4-clorofenol, 2-benzil-4-clorofenol e o-fenilfenol, 2-cloroacetamida e outros, que são comumente recomendados para uso em controle microbial em fábricas de açúcar e álcool. Os antibióticos testados incluem penicillum, clindamycin e cephamandole. Os resultados mostraram que biocidas atuais usados nas fermentações alcoólicas de combustível industriais reduzem a viabilidade da levedura, enquanto os antibióticos foram eficazes na redução de crescimento bacterial, sem afetar a viabilidade da levedura.

Contudo, o uso de antibióticos nas aplicações de etanol combustível tem suas limitações visto que contaminantes microbiais são conhecidos para desenvolver resistência a antibiótico (Lushia e Heist, 2005, Ethanol Producer Magazine, Antibiotic-Resistant Bacteria in Fuel Ethanol Fermentations). Além disso, antibióticos podem ser conduzidos através de grão de destiladores seco, que é um subproduto de plantas de etanol comerciais usadas em alimentações de animal, e este subproduto valioso não pode ser vendido se antibióticos são usados na planta.

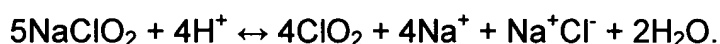
O controle bacterial na fermentação alcoólica de combustível industrial pode também ser efetuado por lavagem com ácido sulfúrico de suspensões de célula de levedura. O etanol combustível comercial no Brasil é produzido por fermentação alimentada por batelada ou contínua de cana-de-açúcar por *Saccharomyces cerevisiae* e emprega reciclo de célula de levedura (de Oliva-Neto e Yokoya, supra). O objetivo do tratamento com ácido é

destruir micro-organismos de contaminação que não podem suportar baixas condições de pH, sem uma redução substancial na viabilidade da levedura ou capacidade fermentativa.

US2009/0117633 descreve um processo para produção de etanol de milho em que uma sacarificação combinada e fermentação são conduzidas em valores de pH tais como 3,5 a 4,0. As enzimas usadas na sacarificação são amilases que são adaptadas para hidrólise de amido sob estes valores de pH relativamente baixos. A sacarificação/fermentação de baixo pH é conduzida com a visão de reduzir contaminantes bacteriais tais como bactérias de ácido láctico e ácido acético. As bactérias contaminantes de ácido láctico e ácido acético crescem melhor a pH 5,0 e acima. Desse modo, na faixa de pH de 3,0 a 4,5, é acreditado que fermentação de etanol predominará porque a levedura crescerá melhor do que as bactérias de contaminação.

O uso de oxidantes para controlar contaminação microbial em fermentações de etanol é também conhecido. Por exemplo, Chang et al. (Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63: 1-6) descreve o uso de sulfito e peróxido de hidrogênio para controlar contaminação bacteriana na fermentação de extrato de malte em etanol com reciclo de levedura.

Dióxido de cloro é um oxidante que é conhecido para ter um efeito bacteriocida e tem sido usado como um desinfetante de água de beber e na indústria de alimentação e de bebida. Existem vários métodos conhecidos para produção de dióxido de cloro, (vide Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual, United States Environmental Protection Agency, April 1999, Chapter 4. Dióxido de cloro, que é incorporado aqui por referência), um dos quais envolve reagir clorito de sódio com ácido de acordo com a seguinte reação:



Clorito de sódio é freqüentemente referido como "dióxido de cloro estabilizado" ou "SCD".

O uso de dióxido de cloro em fermentações de etanol é conhecido conforme colocado em WO 2007/097874, WO 2009/026706, WO 2007/149450 e Johnson e Kunz (The New Brewer, 1998, Coming Clean - A

New Method of Washing Yeast Using Chloro Dioxide Vol. 15 #5-P56). WO 2007/097874 descreve um processo no qual dióxido de cloro é adicionado a um tanque de fermentação, a um carboidrato fermentável adicionado a um tanque de fermentação, ou a um sistema de propagação ou condicionamento usado para preparar o inoculum para uma fermentação. WO 2009/026706 descreve o uso de dióxido de cloro para reduzir contaminação bacteriana em um processo de fermentação empregando reciclo de levedura e utilizando açúcares de estoques de alimentação lignocelulósicos. O dióxido de cloro foi usado para tratar uma pasta fluida de levedura separada a partir da fermentação antes de sua reintrodução ao fermentador. WO 2007/149450 descreve um método para prevenir o crescimento de contaminantes bacteriais em fermentações de levedura para produzir etanol através da adição de dióxido de cloro estabilizado. O dióxido de cloro estabilizado foi adicionado antes de qualquer propagação significativa de bactérias no sistema, tal como para o inoculante ou para açúcares fermentáveis antes de sua introdução ao sistema de fermentação. Conforme o pH da solução é abaixado devido à geração de ácidos orgânicos produzidos por contaminantes bacteriais, dióxido de cloro ativado é gerado *in situ* a partir do dióxido de cloro estabilizado e crescimento adicional de bactérias foi prevenido. Johnson and Kunz (The New Brewer, 1998, Coming Clean - A New Method of Washing Yeast Using Chloro Dioxide Vol. 15 #5-P56) descreve o uso de dióxido de cloro para lavar levedura durante a preparação de cerveja como uma alternativa a lavagem de ácido.

Os efeitos de concentração de ClO_2 na morte de célula bacteriana e viabilidade de levedura e capacidade fermentativa têm sido examinados em fermentações de etanol (vide WO 2009/026706 copendente e da mesma requerente), mas menos informação é disponível com relação ao efeito de outras variáveis na eficiência do dióxido de cloro, tal como pH. Contudo, o impacto de pH na eficiência de dióxido de cloro em outras aplicações industriais tem sido estudado. Na indústria de bebida, tem sido reportado que dióxido de cloro tem uma eficiência constante em um nível de pH entre 4 e 10, com a taxa de esterilização sendo maior do que em pH alto. ("Chloro Dioxide

in the Beverage Industry", Petplanet Insider, September 2005, 6:46-47). Estágios de alvejamento de dióxido de cloro em aplicações de alvejamento de polpa são conduzidos em valores de pH ácidos, embora exista ainda alguma controvérsia sobre o pH ótimo (Reeve, 1996, Section IV: The Technology of Chemical Pulp Bleaching, Chapter 3: Chloro Dioxide in Delignification
5 *In Pulp Bleaching, Principles e Practice*, Ed. by Dence e Reeve, Tappi Press). Foegeding et al. (1986, Journal of Food Science, 51(1):197-201) avaliou inativação de dióxido de cloro de esporos de *Bacillus* e *Clostridium* em água tamponada em valores de pH de 4,5, 6,5 e 8,5 com ácido fosfórico e foi
10 verificado que esporos de *C. perfuringens* foram inativado mais em pH 8,5 do que em 6,5.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona um método para produção de um produto de fermentação. Mais especificamente, a presente invenção se
15 refere a um método para a produção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar.

É um objetivo da invenção proporcionar um método aperfeiçoado para a produção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar.

De acordo com um primeiro aspecto da invenção, é provido um
20 método (A) para produção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar compreendendo: (i) fermentação do hidrolisato de açúcar em um sistema de fermentação para produzir um caldo de fermentação compreendendo um produto de fermentação; (ii) introdução de ácido e um oxidante, incluindo, mas não limitado a, dióxido de cloro, ao referido sistema de fer-
25 mentação de modo a expor quaisquer contaminantes microbiais no referido sistema de fermentação em um ou mais estágios a dióxido de cloro a um pH de menos do que 3,0; e (iii) recuperação do produto de fermentação.

De acordo com um segundo aspecto da invenção, é provido um
30 método (B) para obtenção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar compreendendo: (i) remoção de sólidos de fibra suspensos a partir do hidrolisato de açúcar para obter uma solução de açúcar clareada; (ii) fermentação do açúcar na solução de açúcar clareada em uma reação de

fermentação usando levedura para produzir um caldo de fermentação compreendendo o produto de fermentação; (iii) separação da levedura a partir do caldo de fermentação para produzir uma pasta fluida de levedura e um produto de fermentação, (iv) introdução de ácido e dióxido de cloro à pasta fluida de levedura de modo a expor quaisquer contaminantes microbiais e levedura na referida pasta fluida de levedura a dióxido de cloro a um pH de menos do que 3,0; (v) reintrodução de pelo menos uma porção da pasta fluida de levedura tratada com dióxido de cloro de volta para a etapa de fermentação, etapa (ii), para manter a concentração de levedura na reação de fermentação; e (vi) recuperação do produto de fermentação.

Em concretizações de qualquer dos aspectos precedentes da invenção, o hidrolisato de açúcar compreende pelo menos xilose ou glicose. Em outra concretização, o hidrolisato de açúcar compreende ambas xilose e glicose. O hidrolisato de açúcar pode ser obtido de um estoque de alimentação lignocelulósico. Este pode envolver uma etapa de pré-tratamento do estoque de alimentação lignocelulósico com ácido ou álcali.

De acordo com outra concretização de qualquer aspecto da invenção, o ácido e oxidante são introduzidos ao referido sistema de fermentação de modo a expor continuamente quaisquer contaminantes microbiais no referido sistema de fermentação em um ou mais estágios para o oxidante a um pH de menos do que 3,0.

Sem estar limitado, o produto produzido pela fermentação pode ser ou etanol ou xilitol. Se etanol é o produto de fermentação, ele pode ser produzido por uma sp. *Saccharomyces* que converte glicose e xilose em etanol. Se xilitol é o produto de fermentação, ele pode ser produzido por uma sp. *Candida* que converte xilose em xilitol.

De acordo com concretizações de qualquer aspecto da invenção, na etapa de introdução, o dióxido de cloro está a uma concentração de entre cerca de 0,5 e cerca de 1500 ppm. Em um exemplo da invenção, o dióxido de cloro está a uma concentração de entre cerca de 100 e cerca de 500 ppm. Preferivelmente, contaminantes microbiais e levedura são expostos a dióxido de cloro a um pH de mais do que cerca de 1,0, mas menos do que

2,5. Em um exemplo da invenção, o ácido é adicionado antes ao dióxido de cloro.

Quando reciclo de levedura é empregado de acordo com o segundo aspecto da invenção, a solução de açúcar clareada resultante da etapa de remoção de sólidos de fibra pode compreender açúcar selecionado a partir do grupo consistindo em glicose, xilose, galactose, manose, arabinose, fucose e frutose. Em concretizações adicionais deste aspecto da invenção, a etapa de fermentação pode ser conduzida em uma de uma série de reatores de fermentação, e a pasta fluida de levedura tratada com dióxido de cloro é então reintroduzida de volta para o mesmo ou um reator de fermentação diferente na série. Preferivelmente, quando a pasta fluida de levedura é tratada com ácido e dióxido de cloro, a temperatura da pasta fluida de levedura é entre cerca de 4°C e cerca de 37°C.

A concentração de contaminantes microbiais na pasta fluida de levedura pode ser reduzida a pelo menos 100 vezes mais baixa do que da levedura. Em outra concretização, a concentração de contaminantes microbiais na pasta fluida de levedura é reduzida para abaixo de cerca de 10^3 CFU/mL.

Em ainda uma outra concretização, a concentração de células de levedura na pasta fluida de levedura é de cerca de 10 g/L a cerca de 300 g/L, ou de cerca de 20 g/L a cerca de 200 g/L (peso de célula seca).

A presente invenção supera dificuldades na técnica anterior em conjunto com a conversão eficiente de estoque de alimentação em etanol ou outros produtos de fermentação devido à presença de contaminantes microbiais. Em particular, a invenção é baseada na descoberta que o efeito combinado de um oxidante e baixo pH pode resultar em aperfeiçoamentos significantes na redução de contaminantes microbiais em sistemas de fermentação. Vantajosamente, o processo da presente invenção não resulta em qualquer redução substancial na viabilidade ou capacidade fermentativa da levedura. Portanto, o rendimento do produto de fermentação desejado e a pureza do produto resultante da fermentação podem ser significativamente aperfeiçoados comparado a sistemas convencionais. Além disso, devido à

eficiência aperfeiçoada em pH mais baixo, níveis mais baixos de um oxidante podem ser requeridos relativos a processos não operados em valores de pH abaixo de 3,0. Vantajosamente, isto pode reduzir a demanda química e, desse modo, o custo do processo.

5 Breve Descrição dos Desenhos

Estas e outras características da invenção tornar-se-ão mais aparentes a partir da seguinte descrição em que referência é feita aos desenhos em anexo, em que:

FIGURA 1 mostra um diagrama de fluxo de processo ilustrando reciclo de levedura durante fermentação com adição de ácido seguido por dióxido de cloro a uma pasta fluida de levedura (também referida aqui como "creme de levedura") obtida após separação da levedura a partir do fermentador de acordo com uma concretização da invenção.

FIGURA 2 é um gráfico de barras mostrando contagens bacteriais (CFU/mL) de um creme de levedura contaminado após tratamento com uma dose de massa de 0, 200 e 500 ppm de dióxido de cloro ou em pH 5 (barras cheias), ou precedido por titulação com ácido sulfúrico para pH 2 (barras abertas).

FIGURA 3 é um gráfico de barras mostrando contagens bacteriais (CFU/mL) de um creme de levedura contaminado após tratamento com nenhum ácido ou dióxido de cloro (controle), titulação a pH 2 com ácido mineral com nenhum tratamento de dióxido de cloro (controle de pH) e titulação a pH 2, seguido por tratamento com uma dose de massa de 50, 100, 150 e 200 ppm de dióxido de cloro.

FIGURA 4 é um gráfico de barras mostrando contagens de célula de levedura (CFU/mL) de um creme de levedura contaminado após tratamento com 0, 200 e 500 ppm de dióxido de cloro ou em pH 5 (barras cheias), ou precedido por titulação com ácido sulfúrico a pH 2 (barras abertas).

FIGURA 5 é um gráfico de barras mostrando rendimentos de fermentação a etanol de glicose e xilose e taxas de entrada de xilose. A fermentação de hidrolisato lignocelulósico foi realizada com creme de levedura contaminado após tratamento com 0, 200 e 500 ppm de dióxido de cloro precedido por titulação com ácido sulfúrico a pH 2.

FIGURA 6 é um gráfico de barras mostrando contagens bacteriais (CFU/mL) de um creme de levedura obtido de uma fermentação industrial antes e após titulação com ácido a um pH de 2,0 e antes e após tratamento combinado de dióxido de cloro e ácido para alcançar um pH de 2,0. Barras cheias e barras abertas indicam contagens bacteriais antes de tratamento e após tratamento, respectivamente.

Descrição Detalhada

A presente invenção se refere a um método para a produção de um produto de fermentação de um estoque de alimentação lignocelulósico.

10 A seguinte descrição é de uma concretização por meio de exemplo somente e sem limitação à combinação de características necessárias para efetuar a invenção em efeito.

O hidrolisato de açúcar para o processo pode ser derivado de açúcar e grupos de amido incluindo, mas não limitado a, trigo, milho, beterrabas de açúcar e cana-de-açúcar. Métodos para produção de hidrolisato de 15 açúcares contendo açúcar fermentável de tais estoques de alimentação são bem-conhecidos.

O estoque de alimentação para o processo da presente invenção pode também ser um material lignocelulósico, que inclui qualquer tipo de 20 biomassa de planta tais como, mas não limitado a, biomassa de planta não-lenhosa, grupos cultivados tais como, mas não limitado a, gramas, por exemplo, mas não limitadas a, gramas C4, tais como "switch grass", grama de corda, grama de centeio, "miscanthus", grama de junco, ou uma combinação das mesmas, resíduos de processamento de açúcar, por exemplo, mas não 25 limitado a, bagaço, tal como bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, ou uma combinação dos mesmos, resíduos agrícolas, por exemplo, mas não limitado a, forragem de feijão-soja, forragem de milho, palha de arroz, cascas de arroz, palha de cevada, palha de cana-de-açúcar, espigas de milho, palha de trigo, palha de canola, palha de aveia, cascas de aveia, fibra de 30 milho, ou uma combinação dos mesmos, biomassa de floresta, por exemplo, mas não limitados a, fibra de polpa de madeira reciclada, serragem, madeira dura, por exemplo, madeira de álamo tremedor, ou uma combinação dos

mesmos. Além disso, o estoque de alimentação lignocelulósico pode compreender material de despejo celulósico ou materiais de despejo de floresta tais como, mas não limitados a, papel de impressão para jornal, papelão e similares. O estoque de alimentação lignocelulósico pode compreender uma espécie de fibra ou, alternativamente, o estoque de alimentação lignocelulósico pode compreender uma mistura de fibras que se originam de estoques de alimentação lignocelulósicos diferentes.

Os estoques de alimentação lignocelulósicos compreendem em uma celulose em uma quantidade maior do que cerca de 20%, mais preferivelmente maior do que cerca de 30%, mais preferivelmente maior do que cerca de 40% (w/w). Por exemplo, o material lignocelulósico pode compreender de cerca de 20% a cerca de 50% (p/p) de celulose, ou qualquer quantidade entre esta. O estoque de alimentação lignocelulósico também compreende lignina em uma quantidade maior do que cerca de 10%, mais tipicamente em uma quantidade maior do que cerca de 15% (w/w). O estoque de alimentação lignocelulósico pode também compreender quantidades pequenas de sacarose, fructose e amido. Adicionalmente, o estoque de alimentação pode conter pectina.

A presente invenção pode ser praticada com um material de estoque de alimentação lignocelulósico que tenha sido pré-tratado. Métodos de pré-tratamento são pretendidos para distribuir uma combinação suficiente de ação mecânica e química de modo a romper a estrutura de fibra e aumentar a área superficial de estoque de alimentação para torná-la acessível a enzimas hidrolíticas tais como celulases. A ação mecânica tipicamente inclui o uso de pressão, moagem, trituração, agitação, rasgamento, compressão/expansão e ação mecânica inclui o uso de calor (freqüentemente vapor), ácido ou álcali, e solventes.

O pré-tratamento é preferivelmente um tratamento químico envolvendo a adição de ácido ou álcali. Isto inclui qualquer ácido ou álcali que é adequado para rompimento da estrutura de fibra do estoque de alimentação lignocelulósico e aumentando a acessibilidade do estoque de alimentação lignocelulósico a ser hidrolisado em uma subsequente hidrólise enzimá-

tica. Exemplos não-limitativos de ácido e álcali adequados para tal proposta incluem ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico, ácido sulfuroso, ácido fosfórico, amônia, hidróxido de amônia, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, cal e hidróxido de magnésio.

5 Pré-tratamento com ácido hidrolisa a hemicelulose, ou uma porção da mesma, que está presente no estoque de alimentação lignocelulósico para os açúcares monoméricos incluindo, mas não limitados a, xilose, arabinose, manose, e/ou galactose, e ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido galacturônico e ácido glucorônico. Sacarose, fructose e amido podem
10 também estarem presentes no hidrolisato de açúcar. Preferivelmente, o pré-tratamento com ácido é realizado de modo que hidrólise quase completa da hemicelulose e uma quantidade pequena de conversão de celulose a glicose ocorre. A celulose é hidrolisada à glicose em uma etapa subsequente que usa enzimas celulase. Tipicamente um ácido diluto, a uma concentração de
15 cerca de 0,02% (p/v) a cerca de 2% (p/v), ou qualquer quantidade entre esta, (medida como o peso por cento de ácido puro no peso total de estoque de alimentação seco mais solução aquosa) é usada para o pré-tratamento. Preferivelmente, o pré-tratamento com ácido é efetuado a uma temperatura de cerca de 180°C a cerca de 250°C, ou qualquer temperatura entre estas, por
20 um tempo de cerca de 60 segundos a cerca de 600 segundos, ou qualquer tempo entre estes, a um pH de cerca de 0,8 a cerca de 2,0, ou qualquer pH entre estes.

Um método de realizar pré-tratamento com ácido do estoque de alimentação é explosão por vapor, usando as condições de processo descritas na Patente U.S. No. 4.461.648 (que é incorporada aqui por referência).
25 Outro método de pré-tratamento da pasta fluida de estoque de alimentação envolve pré-tratamento contínuo, significando que o estoque de alimentação lignocelulósico é bombeado através de um reator continuamente. Pré-tratamento com ácido contínuo é familiar àqueles técnicos no assunto, vide, por exemplo, Patente U.S. 5.536.325, WO 2006/128304 e Patente U.S. No.
30 4.237.226 (que são incorporadas aqui por referência). Outras técnicas que são conhecidas na técnica e que podem ser usadas conforme requerido,

incluem, mas não são limitadas a, aquelas descritas na Patente U.S. No. 4.556.430 (Converse et al.; que é incorporada aqui por referência).

Após pré-tratamento, o estoque de alimentação lignocelulósico pode ser separado para obter uma corrente de sólidos compreendendo o
5 estoque de alimentação pré-tratado e uma corrente aquosa compreendendo componentes solúveis. Isto pode ser efetuado por lavagem do estoque de alimentação pré-tratado com uma solução aquosa para produzir a corrente de lavagem, e uma corrente de sólidos compreendendo o estoque de ali-
10 mentação pré-tratado. Alternativamente, o estoque de alimentação pré-tratado é submetido a uma separação de sólidos-líquido, usando métodos conhecidos tais como centrifugação, microfiltração, filtração de estrutura e de placa, filtração de fluxo cruzado, filtração por pressão, filtração a vácuo, e similares. Quando um pré-tratamento ácido é empregado, a fase aquosa compreende açúcares produzidos pela hidrólise de hemicelulose, bem como
15 o ácido adicionado durante o pré-tratamento e quaisquer ácidos orgânicos liberados durante o pré-tratamento. Esta corrente pode ser subseqüentemente processada para remover o ácido mineral e ácido orgânico, e, em seguida, opcionalmente alimentado de volta para a corrente de sólidos com-
20 prendendo o estoque de alimentação pré-tratado. A corrente aquosa obtida a partir do estoque de alimentação pré-tratado ácido pode também ser submetida a fermentação para fermentar os açúcares. Por exemplo, xilose presente nesta corrente pode ser fermentada em alcoóis, incluindo etanol e butanol; ácidos de açúcar incluindo ácido xilônico e ácido arabônico; alcoóis de açúcar incluindo xilitol, arbutol, eritritol, galactitol e manitol; ácidos orgânicos
25 incluindo ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico, ácido pirúvico, ácido acético, ácido itacônico e ácido láctico; cetonas incluindo acetona; e aminoácidos, incluindo ácido glutâmico.

O estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado é tipicamente fluidificado em uma solução aquosa tal como água de processo, água
30 fresca, condensado de vapor ou correntes de reciclo de processo. A concentração de estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado na pasta fluida depende do tamanho de partícula, retenção de água, capacidade de bomba

e outras propriedades do estoque de alimentação. Tipicamente, a concentração é entre cerca de 3% e 30% (p/p), ou qualquer quantidade entre estas de sólidos de fibra (também conhecidos como sólidos suspensos ou não-dissolvidos), ou entre cerca de 10% e cerca de 20% (p/p) de sólidos de fibra, ou qualquer quantidade entre estas. A concentração de sólidos de fibra pode ser mais alta se desidratação da pasta fluida de estoque de alimentação é efetuada antes do pré-tratamento, por exemplo, conforme colocado em PCT/CA2009/001191 (incorporado aqui por referência). A pasta fluida aquosa preferivelmente tem concentração de sólidos que a capacita a ser bombeada. Conforme é bem-conhecido na técnica, a concentração de sólidos suspensos ou não-dissolvidos pode ser determinada por filtração de uma amostra da pasta fluida usando papel de filtro de microfibras de vidro, lavagem da massa de filtro com água, e secagem da massa durante a noite a 105°C. É preferido que os sólidos de fibra compreendam pelo menos cerca de 20% a cerca de 70% de celulose em peso, ou qualquer peso por cento entre estes. Por exemplo, os sólidos de fibra podem compreender 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% ou 70% em peso de celulose.

O pH do estoque de alimentação pré-tratado é tipicamente ajustado de modo que ele esteja dentro de uma faixa que é ótima para as enzimas celulase usadas. Geralmente, o pH do estoque de alimentação pré-tratado é ajustado para estar dentro de uma faixa de cerca de 3,0 a cerca de 7,0, ou qualquer pH entre estes. Por exemplo, o pH pode estar dentro de uma faixa de cerca de 4,0 a cerca de 6,0, ou qualquer pH entre estes, entre cerca de 4,5 e cerca de 5,5, ou qualquer pH entre estes, ou cerca de 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, ou qualquer pH entre estes.

A temperatura do estoque de alimentação pré-tratado é ajustada de modo que ela esteja dentro da faixa ótima para a atividade das enzimas celulase. Geralmente, uma temperatura de cerca de 45°C a cerca de 55°C, ou qualquer temperatura entre estas, é adequada para muitas enzimas celulase, por exemplo, uma temperatura de 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54,

55°C, ou qualquer temperatura entre estas.

As enzimas celulase e a enzima β -glucosidase são adicionadas ao estoque de alimentação pré-tratado, antes, durante, ou após o ajuste da temperatura e do pH da pasta fluida aquosa após pré-tratamento. Preferi-
5 velmente, as enzimas celulase e a enzima β -glucosidase são adicionadas ao estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado após o ajuste da temperatura e do pH da pasta fluida.

Pelo termo "enzimas celulase" ou "cellulases," é significativo uma mistura de enzimas que hidrolisam celulose. A mistura pode incluir celobio-
10 hidrolases (CBH), endoglucanases (EG) e β -glucosidase. Em um exemplo não-limitativo, uma mistura de celulase pode incluir enzimas de CBH, EG e β -glucosidase. A enzima de CBH principalmente hidrolisa cadeias de polímero de celulose de suas extremidades para liberar celobiose, e a enzima EG principalmente hidrolisa polímero de celulose no meio da cadeia. Se o esto-
15 que de alimentação pré-tratado compreende xilano, é especialmente vantajoso se a hidrólise de enzima é também efetuada na presença de uma ou mais enzimas xilanase. Exemplos de enzimas xilanase que podem ser usadas para esta proposta incluem xilanase 1, 2 (Xyn1 e Xyn2) e β -xilosidase, que estão tipicamente presentes em misturas de celulase.

20 A conversão de celobiose em glicose é efetuada pela enzima β -glucosidase. Pelo termo " β -glucosidase", é significativo qualquer enzima que hidrolisa o dímero de glicose, celobiose, em glicose. A atividade da enzima β -glucosidase é definida por sua atividade pela Enzyme Commission como EC 3.2.1.21.

25 O processo da presente invenção pode ser efetutado com qualquer tipo de enzimas celulase adequadas para hidrolise a glicose, indiferente de sua fonte. Exemplos não-limitativos de cellulases que podem ser usadas na prática da invenção incluem aquelas obtidas de fungos do gênero *Aspergillus*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Neurospora* e
30 *Trichoderma*, e de bactérias do gênero *Bacillus* e *Thermobifida*.

A dosagem da enzima celulase é escolhida para converter a celulose do estoque de alimentação pré-tratado em glicose. Por exemplo, uma

dosagem de celulase apropriada pode ser cerca de 0,1 a cerca de 40,0 Unidades de Filtro de Papel (FPU ou IU) por grama de celulose, ou qualquer quantidade entre estas, por exemplo, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 14,0, 16,0, 18,0, 20,0, 22,0, 24,0, 26,0, 28,0, 30,0, 32,0, 34,0, 36,0, 38,0, 40,0 FPU (ou IU) por grama de celulose, ou qualquer quantidade entre estas.

A hidrólise enzimática com enzimas celulase produz uma solução compreendendo glicose, celulose não-convertida, e lignina. Outros componentes que podem estar presentes na pasta fluida de hidrolisato incluem xilose, arabinose, manose e galactose, ácido acético, ácido glucurônico, e ácido galacturônico, bem como sílica, sais insolúveis e outros compostos.

Embora a produção de um hidrolisato de açúcar por pré-tratamento, seguido por hidrólise de celulose do estoque de alimentação pré-tratado com enzimas celulase seja descrita, deve ser compreendido que a corrente de açúcar aquosa pode ocorrer de um tratamento com ácido ou álcali para efetuar uma hidrólise completa da hemicelulose e componentes de celulose do estoque de alimentação a seus respectivos constituintes monoméricos. A hidrólise pode ser efetuada em dois estágios (vide Patente U.S. No. 5.536.325, que é incorporada aqui por referência), ou pode ser realizada em um estágio simples.

De acordo com a invenção, um hidrolisato de açúcar é fermentado por uma ou mais do que uma levedura para produzir um caldo de fermentação compreendendo o produto de fermentação. O hidrolisato de açúcar pode ocorrer de vários estágios no processamento do estoque de alimentação. Conforme descrito anteriormente, um hidrolisato de hemicelulose separado de uma corrente de sólidos compreendendo o estoque de alimentação pré-tratado pode ser enviado para fermentação. Este hidrolisato de açúcar tipicamente compreenderá xilose, glicose, arabinose, manose e galactose. Após separação do hidrosilato de hemicelulose a partir dos sólidos, a celulose no estoque de alimentação pré-tratado pode ser submetida a hidrólise enzimática para produzir glicose e a corrente de glicose resultante pode, em seguida, ser enviada para fermentação. Alternativamente, uma corrente de

estoque de alimentação pré-tratado compreendendo celulose, bem como açúcares monoméricos resultantes de hidrólise de hemicelulose é submetido à hidrólise enzimática com enzimas celulase. Isto produz um hidrolisato de açúcar compreendendo açúcares liberados de hemicelulose durante pré-
5 tratamento, bem como glicose resultante da hidrólise enzimática de celulose. Em uma concretização adicional, um hidrolisato de hemicelulose é separado do estoque de alimentação pré-tratado e, em seguida, é adicionado à corrente compreendendo glicose obtida a partir da hidrólise enzimática de celulose, produzindo, desse modo, uma corrente compreendendo ambos glicose e
10 açúcares monoméricos derivados de hemicelulose, que, por sua vez, é enviado para fermentação. Em ainda uma outra concretização da invenção, o hidrolisato de açúcar enviado para fermentação é obtido por uma hidrólise completa de ácido ou álcali em que ambos a celulose e componentes de hemicelulose do estoque de alimentação são hidrolisados a seus constituin-
15 tes monoméricos.

Em uma concretização preferida, o hidrolisato de açúcar enviado para fermentação é substancialmente livre de sólidos não-dissolvidos, tais como lignina e outros componentes não-hidrolisados. Isto é particularmente vantajoso em concretizações da invenção empregando uma etapa subse-
20 quente de separação e reciclando a levedura do caldo de fermentação, visto que é desejável evitar qualquer reciclo significativo de sólidos não-dissolvidos junto com a levedura. A separação pode ser efetuada por técnicas conhecidas, incluindo centrifugação, microfiltração, filtração de placa de estrutura, filtração de fluxo cruzado, filtração por pressão, filtração a vácuo, e
25 similares.

Qualquer um de um número de leveduras conhecidas pode ser usado para converter açúcar no hidrolisato de açúcar em etanol ou outros produtos de fermentação. Isto inclui, mas não é limitado a, levedura do gênero *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Candida*. Adicio-
30 nalmente, leveduras comercialmente disponíveis pode ser usada, incluindo, mas não limitado a, Turbo levedura, Etanol Red® Safdistil®, Thermosac®, Fermiol®, Fermivin® ou Superstart®. A levedura pode ser geneticamente

projetada para fermentar ambos açúcares de hexose e pentose em etanol. Alternativamente, a levedura pode ser uma cepa que tenha sido tornada capaz de fermentar xilose por um ou mais métodos não-recombinantes, tais como evolução adaptativa ou mutagênese aleatória e seleção.

5 Por exemplo, a fermentação pode ser realizada com levedura *Saccharomyces* recombinante. A cepa de levedura recombinante pode ser uma cepa que tenha sido capaz de fermentar xilose por incorporação re-combinante de (a) genes que codificam xilose reductase (XR) e xilitol de-
10 5.866.382, 6.582.944 e 7.527.927 e EP 450 530) e/ou (b) gene(s) que codifi-
ca(m) uma ou mais xilose isomerase (XI) (vide, por exemplo, Patentes dos
Estados Unidos Nos. 6.475.768 e 7.622.284). Em adição a cepa de levedura
modificada pode também sobre expressar um gene endógeno ou heterólogo
que codifica xiluloquinase.

15 Outra levedura além de *Saccharomyces cerevisiae* pode fermentar açúcares de hexose e pentose em etanol. Isto inclui, mas não é limitado a, levedura do gênero *Hansenula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Candida*. WO 2008/130603 descreve cepas de *Hansenula polymorpha* com produção au-
mentada de etanol de xilose. Além disso, mutantes de *Pichia stipitis* e *Can-
20 dida shehatae* foram isolados pelo método descrito na Patente U.S. No. 5.126.266.

Em outro exemplo da invenção, a xilose é convertida em um álcool de açúcar. O álcool de açúcar pode ser selecionado de xilitol, arbutol, eritritol, manitol e galactitol. Preferivelmente, o álcool de açúcar é xilitol. Em
25 uma concretização da invenção, a xilose é fermentada em xilitol por levedura. Leveduras que são capazes de converter xilose em xilitol incluem cepas de *Candida*, *Pichia*, *Pachysolen*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces*. DE acordo com uma concretização da invenção, a cepa de levedura é *Candida*, preferivel-
30 mente *C. tropicalis*.

A fermentação pode ser realizada em ou perto da temperatura e pH ótimos do micro-organismo de fermentação. A faixa de temperatura para

a fermentação pode ser entre cerca de 10°C a cerca de 70°C, embora a temperatura possa ser mais alta se a levedura é naturalmente ou geneticamente modificada para ser termoestável. Por exemplo, a temperatura pode ser de cerca de 10°C a cerca de 55°C, ou qualquer temperatura entre estas, ou
5 cerca de 15°C a cerca de 45°C, ou qualquer temperatura entre estas. O pH da fermentação pode ser entre cerca de 3 e cerca de 6, ou qualquer pH entre estes, por exemplo, um pH de 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, ou qualquer pH entre estes. A dose do micro-organismo de fermentação dependerá de outros fatores, tais como a atividade do micro-organismo de fermentação, o
10 tempo de fermentação desejado, o volume do reator e outros parâmetros. Será apreciado que estes parâmetros podem ser ajustados conforme desejado por um técnico no assunto para alcançar condições ótimas de fermentação.

O hidrolisato de açúcar pode também ser suplementado com nutrientes adicionais requeridos para crescimento e desempenho de fermentação do micro-organismo de fermentação. Por exemplo, extrato de levedura, amino ácidos específicos, fosfato, fontes de nitrogênio, sais, elementos de traço e vitaminas podem ser adicionados ao hidrolisato de açúcar para suportar crescimento e otimizar produtividade do micro-organismo. (Vide também Verduyn et al., 1992, *Yeast* 8(7):501-170, Jørgensen, 2009, *Appl Biochem Biotechnol*, 153:44-57 e Zhao et al., 2009, *Journal of Biotechnology*, 139:55-60, que são cada um incorporado aqui por referência). Tipicamente a fermentação é conduzida sob condições anaeróbicas, embora fermentações aeróbicas ou microaeróbicas estejam também incluídas dentro do escopo da
25 invenção.

O termo "sistema de fermentação", inclui qualquer arranjo de um ou mais reatores de fermentação para fermentação de açúcares a um produto de fermentação por levedura. Nas concretizações da invenção, isto inclui sistemas que empregam reciclo de levedura. O sistema de fermentação pode também compreender tanques para condicionamento de levedura. Em
30 uma operação de escala comercial típica, a fermentação é conduzida em um sistema usando reatores múltiplos, tais como 2 a 6, ou qualquer número en-

tre estes. Os reatores de fermentação podem ser dispostos em série ou paralelo. A fermentação pode ser conduzida em modos de batelada, contínuo ou alimentado por batelada, com ou sem agitação. Em uma concretização da invenção, o(s) reator(es) de fermentação(ões) é(são) agitado(s) levemente com mistura.

Os contaminantes microbiais são expostos a oxidante a um pH que é menor do que 3,0 pela adição de ácido. O pH pode ser maior do que cerca de 1, porém menor do que 3,0. Isto inclui todos os subvalores entre estes, por exemplo, um pH de 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8 ou 2,9, ou qualquer pH entre estes, está incluído dentro do escopo da invenção. Exemplos de faixas de pH que podem ser empregadas incluem cerca de 1,0 a 3,0, 1,0 a 2,9, 1,0 a 2,8, 1,0 a 2,75, 1,0 a 2,5, 1,0 a 2,4, 1,0 a 2,3, 1,0 a 2,2, 1,0 a 2,1 ou 1,0 a 2,0,

Em uma concretização da invenção, o ácido é um ácido mineral tais como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido sulfuroso, ácido fosfórico, ou ácido nítrico.

Qualquer corrente do sistema de fermentação contendo contaminantes microbiais pode ser exposta ao oxidante a um pH de menos do que 3,0. Tipicamente cada corrente também compreenderá levedura, junto com os contaminantes microbiais, embora o oxidante e o ácido possam ser introduzidos em um hidrolisato de açúcar antes da adição de levedura.

Quando dióxido de cloro é o oxidante, o ácido pode ser adicionado antes da adição de dióxido de cloro ou uma mistura de dióxido de cloro e ácido pode ser introduzida ao sistema de fermentação. Dióxido de cloro reage rapidamente e, desse modo, é tipicamente não vantajoso para adicionar este oxidante antes da adição de ácido.

Nas concretizações da invenção empregando reciclo de levedura, o ácido pode ser adicionado primeiro à pasta fluida de levedura que é separada do caldo de fermentação, seguido por adição do oxidante. Alternativamente, uma mistura do ácido e oxidante é adicionada à pasta fluida de levedura antes do tratamento de oxidante.

Um oxidante adequado para uso na invenção reduz contaminan-

tes bacteriais a um nível pelo qual eles não reduzem a produtividade ou rendimento de produto da fermentação. O oxidante não deve ter qualquer efeito significativo na viabilidade da levedura ou capacidade fermentativa. Além disso, o oxidante selecionado para uso na invenção possui eficiência máxima na redução de contaminantes bacteriais a um pH de menos do que 3,0, ou menos do que 2,5. Um oxidante adequado pode ser selecionado por aqueles versados na técnica por experimentação de rotina. Sem estar limitado, o oxidante pode ser dióxido de cloro ou ozônio.

Preferivelmente, o tratamento de oxidante reduz a concentração de contaminantes microbiais (em unidades de formação de colônia por mL de cultura ou CFU/mL) a cerca de 100 vezes menor do que a concentração de levedura (em unidades de formação de colônia por mL de cultura ou CFU/mL). Mais preferivelmente, o tratamento de oxidante reduz a concentração de contaminantes microbiais a cerca de 10^3 CFU/mL ou menor. Por exemplo, o tratamento de oxidante pode reduzir a concentração de contaminantes microbiais de cerca de 10^{10} a cerca de 10^3 CFU/mL. Colônias bacteriais são enumeradas através métodos de contagem de placa padrão. Métodos são conhecidos para seletivamente colocar colônias bacteriais e inibir crescimento de levedura. Um exemplo de tal método envolve preparação de diluições em série e colocação de placas agar contendo ciclo-hexamida, que mata seletivamente levedura, mas não bactéria (vide, por exemplo, Exemplo 1.1).

O oxidante pode ser introduzido ao sistema de fermentação compreendendo levedura e contaminantes microbiais a uma concentração de cerca de 0,5 ppm e cerca de 1500 ppm, ou qualquer concentração entre estas. Em um sistema contínuo, o oxidante tipicamente seria adicionado a uma ou mais correntes contendo contaminantes microbiais. Em outra concretização da invenção, o oxidante, incluindo, mas não limitado a, dióxido de cloro pode ser adicionado a uma concentração entre cerca de 60 a cerca de 1000 ppm ou entre cerca de 75 a cerca de 1000 ppm, incluindo entre cerca de 75 ppm e cerca de 500 ppm, ou entre cerca de 80 a cerca de 1000 ppm ou entre cerca de 90 a cerca de 1000 ppm ou entre cerca de 100 a cerca de 500 ppm, ou qualquer concentração entre estas. Por exemplo, o oxidante, inclu-

indo, mas não limitado a, dióxido de cloro, pode ser adicionado a uma concentração de 0,5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 ou 1500 ppm, ou qualquer concentração entre estas.

5 O dióxido de cloro pode ser gerado usando-se métodos conhecidos, por exemplo, por reação de gás cloro com água e, em seguida, adicionando-se clorito de sódio, ou por reação de hipoclorito de sódio com um ácido e adicionando-se clorito de sódio. Em um exemplo da invenção, dióxido de cloro estabilizado (SCD) é acidificado e o dióxido de cloro então produzido
10 do pode ser introduzido à fermentação tal como à pasta fluida de levedura acidificada se reciclo de levedura é utilizado. Alternativamente, após adição de ácido, SCD pode ser adicionado diretamente à fermentação. Neste último exemplo, dióxido de cloro será gerado *in situ*. (Vide, por exemplo, Kim et al., 2008, Food Microbiology, 25:964-969 e WO 2007/149450).

15 O tratamento de oxidante é preferivelmente conduzido a uma temperatura de entre cerca de 4°C e cerca de 40°C, ou qualquer temperatura entre estas, por exemplo 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40°C, ou qualquer temperatura entre estas. A duração do tratamento pode ser de 5 segundos a cerca de 60 min, ou qualquer tempo entre estes, por exemplo, 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 segundos, ou 10,
20 20, 30, 40, 50, 60 minutos ou qualquer tempo entre estes. Conforme seria apreciado por aqueles versados na técnica, reações envolvendo dióxido de cloro pode prócer rapidamente ou mesmo instantaneamente. Conseqüentemente, quando este oxidante é utilizado, tempos de residência mais curtos
25 podem ser utilizados ou o tempo de residência pode ser eliminado. Contudo, a prática desta invenção não é limitada por qualquer escolha particular de tempo de residência durante o tratamento de oxidante.

Naquelas concretizações empregando reciclo de levedura, a concentração de células na pasta fluida de levedura (também referida aqui
30 como "creme de levedura") que é exposta ao oxidante e ácido é tipicamente de cerca de 50 g/L a cerca de 300 g/L (peso de célula seco). Por exemplo, a concentração de células na pasta fluida de levedura pode ser 50, 60, 70, 80,

90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 ou 300 g/L (peso de célula seco). Mais preferivelmente, a concentração de células na pasta fluida de levedura é de cerca de 50 g/L a cerca de 300 g/L, ou de cerca de 150 g/L a cerca de 250 g/L, ou de cerca de 175 g/L a cerca de 225 g/L (peso de célula seco).

A fermentação pode ser conduzida de modo que as leveduras sejam separadas da fermentação e enviadas de volta para a reação de fermentação (também referida aqui como "reciclo de levedura"). Isto envolve retirada de caldo de fermentação a partir do reator de fermentação e separação da levedura de sua solução por técnicas de separação conhecidas para produzir uma pasta fluida de levedura. Exemplos de técnicas de separação adequadas incluem, mas não estão limitados a, centrifugação, microfiltração, filtração de placa e de estrutura, filtração de fluxo cruzado, filtração de pressão, assentamento, filtração a vácuo, e similares. Em um exemplo da invenção, o reciclo é contínuo, significando que a levedura é continuamente reciclada através do sistema de fermentação. Em uma concretização alternativa, o reciclo de levedura é operado em modo de batelada.

Após tratamento da pasta fluida de levedura acidificada com o oxidante, a pasta fluida de levedura tratada com oxidante é reintroduzida de volta para a reação de fermentação. Uma sangria de levedura pode ser empregada após separação da levedura a partir da fermentação e antes da exposição ao oxidante e baixo pH. Preferivelmente, entre cerca de 10% e cerca de 99%, ou qualquer quantidade entre estas, das células de levedura totais na pasta fluida de levedura são tratadas com o oxidante e ácido e então recicladas. Mais preferivelmente, entre 80% e 95% das células de levedura são tratadas e recicladas e, mais preferivelmente, pelo menos 90% das células de levedura são tratadas e recicladas.

Deve ser compreendido que a prática da invenção não é limitada pelo número de ciclos de reciclo de célula de levedura. O reciclo de levedura pode ser repetido pelo menos uma vez, ou entre 5 e 70 vezes, ou ainda mais vezes do que isto. Sem pretender de qualquer maneira estar limitado, o reciclo de levedura pode ser repetido 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55,

60, 65 ou 70 vezes. Deve também ser compreendido que o tratamento de oxidante não necessita ser realizado com todo reciclo. A frequência de tratamento pode ser ajustada por um técnico no assunto conforme desejado para otimizar o desempenho e minimizar números bacteriais.

5 Uma fermentação pode empregar múltiplos reatores de fermentação. Em tais concretizações, levedura é retirada de um reator no sistema, tratada com o ácido e dióxido de cloro ou outro oxidante adequado e, em seguida, reintroduzido de volta para um ou mais dos reatores de fermentação. A levedura tratada com oxidante acidificada pode ser alimentada de volta para o mesmo reator nas séries ou um reator diferente. Pela recirculação da levedura dessa maneira, sua concentração é mantida e condicionada em hidrolisato lignocelulósico que aumenta a taxa volumétrica da reação e também maximiza o rendimento para o produto desejado pela minimização do desvio de carbono e outros nutrientes em produção de célula de bactéria.

10 Referindo-se agora à Figura 1 é representado um sistema de fermentação com reciclo de levedura. A Figura 1 é incluída como um exemplo de como a presente invenção pode ser praticada e não é significativa para estar limitando em qualquer maneira. Isto é, a invenção pode ser praticada com ou sem reciclo de levedura.

15 Um hidrolisato de açúcar aquoso **6** obtido de pré-tratamento do estoque de alimentação lignocelulósico é alimentado a um primeiro reator de fermentação **8**. A corrente de açúcar é previamente tratada para remover lignina insolúvel e outros sólidos suspensos. A corrente de açúcar **6** é combinada com levedura de um tanque de condicionamento **14** da linha **16** ou da linha **38** contendo levedura reciclada. O tanque de condicionamento **14**, por sua vez, é alimentado com uma corrente contendo ar e uma porção de açúcar da corrente **6**. Uma solução fermentada compreendendo etanol é retirada do reator **8** através da linha **18** e alimentada para uma unidade de separação **22**, tipicamente uma centrífuga, que separa a levedura a partir da solução fermentada. Cerveja separada, que contém etanol, é enviada para destilação para obter uma solução enriquecida em etanol. Uma porção da pasta fluida de levedura na linha **26** é sangrada e após sangria, o restante

da levedura é acidificado em seguida lavado com uma solução aquosa de dióxido de cloro a um pH de menos do que 3 e subseqüentemente alimentado através da linha **26** para um tanque de retenção **30** onde eles são mantidos sob condições apropriadas. A levedura tratada com dióxido de cloro acidificada é, em seguida, alimentada junto com a linha **34**, que se ramifica na linha **38**, que, por sua vez, introduz uma porção da levedura de volta para o fermentador **8** para converter xilose em etanol. O restante da levedura pode ser enviado através da linha **34** para o tanque de condicionamento **14** para crescimento de célula e subseqüente para este, a levedura é enviada para o segundo fermentador **42**, e o ciclo é repetido uma vez novamente. Este ciclo pode, então, ser repetido com os três fermentadores **46**.

Embora três fermentadores sejam representados na Figura 1, será apreciado por aqueles versados na técnica que o número de fermentadores pode ser variado conforme requerido. Além disso, embora os fermentadores sejam mostrados em paralelo, eles podem ao invés serem dispostos em série. Além disso, é contemplado que o tanque de retenção **30** possa ser excluído, em cujo caso a levedura é subseqüentemente mantida, por exemplo, no fermentador **8**. Em ainda uma outra variação, toda a levedura da linha **34** é enviada de volta para o fermentador **8** através da linha **38** sem uma porção sendo desviada para condicionamento. Alternativamente, toda a levedura na linha **34** é enviada para o tanque de condicionamento **14** e subseqüentemente para o fermentador **2**.

Quando etanol é o produto da fermentação, ele é recuperado por destilação. O caldo de fermentação separado ou cerveja enviado para a destilação é uma solução de álcool diluta que é substancialmente livre de sólidos, incluindo celulose não-convertida, embora possa conter componentes adicionados durante a fermentação para suportar crescimento dos microorganismos, bem como pequenas quantidades de levedura que podem permanecer após separação **16**. A cerveja é preferivelmente degaseificada para remover dióxido de carbono e, em seguida, bombeada através de uma ou mais colunas de destilação para separar o álcool dos outros componentes na cerveja. A(s) coluna(s) na unidade de destilação é (são) preferivelmente

operada(s) em um modo contínuo, embora deva ser compreendido que processos de batelada são também envolvidos pela presente invenção. Além disso, a(s) coluna(s) pode(m) ser operada(s) a qualquer pressão e calor adequados para o processo de destilação ser adicionado em um ou mais pontos ou por injeção de corrente direta ou indiretamente através de trocadores de calor. A unidade de destilação pode conter uma ou mais cerveja separada e colunas de retificação, em cujo caso cerveja diluta é enviada para a coluna de cerveja onde é parcialmente concentrada. A partir de cada coluna de cerveja, o vapor vai para uma coluna de retificação para purificação adicional. Alternativamente, uma coluna de destilação é empregada que compreende uma seção de enriquecimento integral ou de retificação. A água remanescente pode ser removida do vapor por uma resina de peneira molecular, por adsorção, ou outros métodos conhecidos àqueles técnicos no assunto. O vapor pode então ser condensado e desnaturado.

A presente invenção será adicionalmente ilustrada nos seguintes exemplos. Contudo, é para ser compreendido que estes exemplos são para proposta ilustrativa somente, e não devem ser usados para limitar o escopo da presente invenção de qualquer maneira.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Tratamentos de dióxido de cloro de creme de levedura acidificado: eficiência antibacterial e requerimentos de dose

Exemplo 1.1: Efeito sinérgico antibacterial de dióxido de cloro e pH.

Palha de trigo pré-tratada de ácido diluto foi produzida em uma escala industrial conforme colocado na Patente U.S. No. 4.461.648 (incorporada aqui por referência) e então hidrolisada com enzimas celulase e β -glucosidase para produzir um hidrolisato contendo açúcar derivado dos componentes de hemicelulose e celulose do estoque de alimentação. Este hidrolisato foi fermentado em uma fermentação industrial para produzir etanol com uma cepa de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* colocada no N° de Série dos Estados Unidos co-pendente e de propriedade da mesma requerente 61/291,011 (incorporado aqui por referência). O reciclo de levedura foi empregado durante a fermentação.

Um creme de levedura (também referido aqui como uma "pasta fluida de levedura") separado do caldo de fermentação e contaminado com bactéria que prolifera na fermentação industrial foi tratado a 20°C com ácido sozinho, dióxido de cloro sozinho ou uma combinação dos dois. Na condição tratada com ácido, o pH foi abaixado de 5,0 a 2,0 com ácido sulfúrico. Na condição tratada com dióxido de cloro, um estoque concentrado de dióxido de cloro em água (10.000 ppm) foi preparado pela passagem de uma mistura de cloro e gás nitrogênio através de colunas de clorito de sódio. O gás ClO₂ resultante foi aspergido em 4 L de água fria deionizada até que a concentração desejada foi alcançada. Esta solução de dióxido de cloro foi usada para tratar o creme de levedura.

No tratamento de combinação, o creme de levedura foi primeiro abaixado para pH 2,0 com ácido sulfúrico por 5 minutos e subsequentemente com a dose de massa indicada de dióxido de cloro por 5 minutos. Em casos onde o pH foi abaixado, o creme de levedura foi titulado de volta para 5,0 com hidróxido de sódio após 10 minutos e antes da colocação para enumeração bacteriana. A duração de exposição a ácido foi limitada em 10 minutos para equiparar a duração de exposição para os outros tratamentos.

Colônias bacterianas foram enumeradas via métodos de contagem de placa padrão. De modo a colocar seletivamente colônias bacterianas e inibir crescimento de levedura, placas de ágar de soja típicas (15 g/L de digestão pancreática de caseína, 5 g/L de digestão enzimática de farinha de soja, 5 g/L de cloreto de sódio e 15 g/L de ágar) com 100 mg/L de ciclo-heximida foram usados. As mostras foram diluídas em série em salina estéril (0,9% de NaCl w/v) antes de colocação.

A Figura 2 ilustra o efeito sinérgico de dióxido de cloro e baixo pH. As barras de erro representam o desvio padrão da média de experimentos duplicados, cada colocado em triplicata. Estes dados demonstram que o abaixamento do pH sozinho ou dióxido de cloro sozinho não são tão eficazes na redução de população bacteriana comparada a quando o pH é abaixado primeiro e em seguida seguido com um tratamento de dióxido de cloro no baixo pH. O aumento da dose de dióxido de cloro tem um efeito desprezível

nas populações bacteriais a pH 5,0 (comparar barras preenchidas a 0, 200 e 500 ppm de dióxido de cloro). Similarmente, o abaixamento do pH sem dióxido de cloro não reduz significativamente a população bacteriana (comparar barras fechadas e abertas a 0 ppm de dióxido de cloro). Quando combinado com pH abaixado, tratamentos de dióxido de cloro de 200 ppm e 500 ppm reduziu a população bacteriana por 10^2 CFU/mL e 10^3 CFU/mL, respectivamente (vide barras abertas a 200 ppm e a 500 ppm).

Exemplo 1.2: Efeito de dose de dióxido de cloro na contaminação bacteriana de uma cultura de fermentação de levedura.

10 Creme de levedura contaminado obtido a partir da fermentação do Exemplo 1.1 foi titulado a pH 2,0 com ácido sulfúrico, tratado com várias concentrações de dióxido de cloro (0, 50, 100, 150 e 200 ppm) e colocado para determinar a redução bacteriana a pH 2,0 conforme esboçado acima, com a exceção que a temperatura do tratamento foi 30°C preferivelmente do que 20°C.

15 As populações bacterianas foram enumeradas conforme previamente descrito (Exemplo 1.1). As populações bacterianas foram também enumeradas em uma amostra de controle que não foi submetida a dióxido de cloro ou titulação de pH.

A Figura 3 ilustra os resultados. As barras de erro representam o desvio padrão do meio de experimentos duplicatas, cada um colocado em triplicata. Conforme mostrado na figura, uma dose de dióxido de cloro de 100 ppm a pH 2 e 30°C reduziu contaminação em um creme de levedura por 100 vezes. O creme de levedura tratado com 200 ppm de dióxido de cloro a 30°C diminuiu as contagens bacterianas por uma grandeza de mais do que 10^5 , que é uma redução maior do que 500 ppm de tratamento à temperatura ambiente (redução de 100 vezes; vide Figura 2). Estes resultados demonstram que aumentando a temperatura do tratamento por 10°C aumenta adicionalmente a reatividade de ClO_2 , que permite eficiência aumentada em dosagem diminuída. Notavelmente, a 200 ppm, as placas de diluição de 10^3 CFU/mL não tinham crescimento bacteriano, indicando que a redução bacteriana máxima foi maior do que 10^5 CFU/mL a 200 ppm. A adição de ácido sozinho (controle de pH) não reduziu a população bacteriana.

Exemplo 2: Baixo pH e tratamentos de dióxido de cloro antibacteriana em

viabilidade de cultura de levedura e desempenho de fermentação.

Uma amostra do creme de levedura do Exemplo 1.1 foi colocada para crescimento de levedura após os tratamentos esboçados no mesmo. Isto é, cremes de levedura contaminados foram tratados a 20°C com ácido sulfúrico sozinho a pH 2 ou em combinação com dióxido de cloro a 0, 200 e 500 ppm. Crescimento de levedura seletivo foi capacitado por diluição em série do creme em salina estéril (0,9% de NaCl p/v) e colocação em placas de YM (10 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 20 g/L de ágar) contendo 34 mg/L de cloramfenicol para inibir crescimento bacteriam.

Os resultados são mostrados na Figura 4. As barras de erro representam o desvio padrão da média de experimentos duplicata, cada uma colocada em triplicata. A figura indica claramente que a viabilidade da cultura de levedura de fermentação é não-afetada por nem tratamento de ácido nem a combinação de ácido e dióxido de cloro. Conforme pode ser visto, o aumento da dose de dióxido de cloro tem um efeito desprezível nas populações de levedura de fermentação indiferente do pH do tratamento.

O desempenho de fermentação de levedura foi avaliado por inoculação da levedura de controle contaminada, levedura tratada com ácido e combinação de cremes de levedura tratados com ácido-dióxido de cloro (tratado como colocado no Exemplo 1.1) em 400 mL de hidrolisato lignocelulósico. O hidrolisato lignocelulósico foi produzido conforme colocado no Exemplo 1.1. Antes da inoculação, o meio foi aspergido com CO₂ puro por dois minutos para assegurar anaerobicidade. As células foram permitidas fermentarem a 30°C, 150 rpm até exaustão de açúcar. A produção de CO₂ foi monitorada para o curso da fermentação e as amostras foram tomadas para peso de célula seco e análise de HPLC.

As amostras foram analisadas para massa de célula usando peso de célula seco (Rice et al. (1980) *Am. Soc. Brew. Chem. J.* 38:142-45, que é incorporado aqui por referência). Para a análise de fermentabilidade, as amostras foram tomadas a partir de biorreatores usando uma seringa de 10 mL. DE cada amostra, volumes de 2 mL foram centrifugados e o sobre-

nadante decantado e filtrado através de um filtro de seringa de 0,2 µm. Cada amostra de sobrenadante foi diluída com ácido sulfúrico a 5 mM. Todas as diluições foram analisadas para teor de glicose, xilose, xilitol, glicerol, e etanol no Agilent 1100 Series Refractive Index Detector HPLC, enquanto ácido acético e láctico foram analisados concorrentemente usando um Agilent 1200 Series Variable Wavelength Detector HPLC. A coluna usada para separação foi a coluna Varian Metacarb 87H Organic Acid, mantida a 50°C com fase móvel de ácido sulfúrico a 5 mM a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. A unidade foi equipada com o Auto-Amostrador 1100 Séries e Sistema de Bombeio e controlada com o software Chemstation.

Taxas de entrada de xilose e rendimentos em etanol de glicose e xilose para a fermentação de hidrolisatos lignocelulósicos são mostradas na Figura 5. Usando-se concentrações de célula equivalente, a taxa de consumo de xilose no hidrolisato lignocelulósico exibe uma diminuição relativa com ambos o tratamento de ácido e combinação de tratamento de ácido-dióxido de cloro. Segue que a taxa de consumo de xilose seria mais alta no controle não-tratado à medida que os micróbios de contaminação consomem xilose. Isto é adicionalmente suportado pela mudança observada em rendimento de etanol de xilose. As taxas diminuídas indicam que as bactérias não estão mais consumindo xilose e permitem que muito deste açúcar seja convertido em etanol pela fermentação da levedura, aumentando, desse modo, o rendimento. Pode também ser observado que a diminuição nas taxas, acoplada com o aumento nos rendimentos é maior com a combinação de tratamento de ácido-dióxido de cloro do que com tratamento de ácido sozinho.

Exemplo 3: Efeito antibacterial de dióxido de cloro e pH em operações de escala industrial.

Hidrolisato de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado de ácido diluto foi produzido conforme colocado na Patente U.S. No. 4.461.648 (incorporada aqui por referência). O hidrolisato foi fermentado para produzir etanol com a cepa de levedura colocada no N° de Série dos Estados Unidos co-pendente de propriedade da mesma requerente 61/291.011 (incorporada aqui por referência).

Um volume de 100.000 L de caldo de fermentação total foi separado em uma fração de cerveja e um creme de levedura após completação da fermentação. O creme de levedura foi concentrado para aproximadamente 170 g em peso de célula seco/L. Antes de reciclo na próxima batelada de fermentação, o creme de levedura contaminado com bactéria foi tratado a 20°C com ácido sozinho (batelada 1) ou tratado com ácido em combinação com dióxido de cloro (batelada 2). Durante tratamento com ácido para cada uma das duas bateladas, o pH do creme de levedura concentrado foi abaixado para 2,0 usando adição em linha de 93% (p/v) de ácido sulfúrico. Dióxido de cloro foi gerado na forma concentrada a uma concentração nominal de 2700 ppm usando um sistema comercialmente disponível de Pureline, Palatine, IL. No tratamento de combinação, a acidez do creme de levedura foi primeiro abaixada para pH 2,0 (como por Exemplo 1.1) e subseqüentemente tratada a uma dose de massa de 200 ppm de dióxido de cloro com um tempo de residência de aproximadamente 45 segundos. Após tratamento, o creme de levedura foi realimentado na fermentação.

As colônias bacteriais foram enumeradas através de métodos de contagem de placa padrão. De modo a colocar seletivamente colônias bacteriais e inibir crescimento de levedura, placas Ágar de soja trípticas (15 g/L de digestão pancreática de caseína, 5 g/L de digestão enzimática de farinha de feijão-soja, 5 g/L de cloreto de sódio e 15 g/L de agar) com 100 mg/L de ciclo-heximida foram usados. As amostras foram diluídas em série em salina estéril (NaCl p/va 0,9%) antes da colocação.

A Figura 6 ilustra a eficiência de tratamento de ácido combinado e uso de dióxido de cloro de baixo pH. O abaixamento do pH através da adição de ácido sulfúrico reduziu contagens de contaminação bacteriana por 100 vezes, enquanto tratamento de ácido em combinação com a adição de dióxido de cloro foi capaz de diminuir contagens de contaminação bacteriana por 10^4 CFU/mL.

A presente invenção foi descrita com relação a uma ou mais concretizações. Contudo, será aparente aos técnicos no assunto que um número de variações e modificações podem ser feitas sem fugir do escopo da invenção conforme definido nas reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar compreendendo:

- 5 (i) fermentação do hidrolisato de açúcar em um sistema de fermentação com levedura para produzir um caldo de fermentação compreendendo um produto de fermentação;
- (ii) introdução de ácido e dióxido de cloro ao referido sistema de fermentação de modo a expor quaisquer contaminantes microbiais no referido sistema de fermentação em um ou mais estágios a dióxido de cloro a um
10 pH de menor do que 3,0; e
- (iii) recuperação do produto de fermentação.

2. Método para obtenção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar compreendendo:

- 15 (i) remoção de sólidos de fibra suspensos a partir do hidrolisato de açúcar para obter uma solução de açúcar clareada;
- (ii) fermentação de açúcar na solução de açúcar clareada em uma reação de fermentação usando levedura para produzir um caldo de fermentação compreendendo o produto de fermentação;
- (iii) separação da levedura do caldo de fermentação para produzir
20 uma pasta fluida de levedura e um produto de fermentação;
- (iv) introdução de ácido e dióxido de cloro à pasta fluida de levedura de modo a expor quaisquer contaminantes microbiais e levedura na referida pasta fluida de levedura a dióxido de cloro a um pH de menos do que 3,0;
- (v) reintrodução de pelo menos uma porção da pasta fluida de levedura tratada com dióxido de cloro de volta para a etapa of fermentação para
25 manter a concentração de levedura na reação de fermentação; e
- (vi) recuperação do produto de fermentação.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que a etapa de fermentação (etapa ii) é conduzida em uma de uma série de reatores de
30 fermentação e no qual na etapa de reintrodução (etapa v), a pasta fluida de levedura tratada com dióxido de cloro é reintroduzida de volta para o mesmo ou um reator de fermentação diferente nas séries.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que na etapa de remoção (etapa i), a solução de açúcar clareada compreende um açúcar selecionado a partir do grupo consistindo em glicose, xilose galactose, manose, arabinose, fucose e fructose.
- 5 5. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o hidrolisato de açúcar compreende pelo menos xilose ou glicose.
6. Método, de acordo com a reivindicação 5, em que o hidrolisato de açúcar compreende xilose e glicose.
7. Método, de acordo com a reivindicação 6, em que na etapa de
10 fermentação, o produto de fermentação é etanol e no qual a levedura é um sp. *Saccharomyces* que converte glicose e xilose em etanol.
8. Método, de acordo com a reivindicação 5, em que o hidrolisato de açúcar compreende xilose.
9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que na etapa de
15 fermentação, a levedura é uma sp. *Candida* que converte a xilose em xilitol.
10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que na etapa de introdução, o dióxido de cloro é adicionado a uma concentração de entre cerca de 0,5 e cerca de 1500 ppm.
11. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que na etapa
20 de introdução, o dióxido de cloro é adicionado a uma concentração de entre cerca de 75 e cerca de 500 ppm.
12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que o hidrolisato de açúcar é derivado de um estoque de alimentação lignocelulósico.
- 25 13. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que na etapa de introdução, a concentração dos contaminantes microbiais na pasta fluida de levedura é reduzida para pelo menos 100 vezes mais baixa do que aquela da levedura.
14. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que na etapa
30 de introdução, a concentração de contaminantes microbiais na pasta fluida de levedura é reduzida abaixo de cerca de 10^3 CFU/mL.
15. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que na etapa

de introdução, a concentração de células de levedura na pasta fluida de levedura é de cerca de 10 g/L a cerca de 300 g/L em peso de célula seca.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que na etapa de introdução, a concentração de células de levedura na pasta fluida de levedura é de cerca de 20 g/L a cerca de 200 g/L em peso de célula seca.

17. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que na etapa de introdução, a temperatura da pasta fluida de levedura é entre cerca de 4°C e cerca de 37°C.

18. Método, de acordo com a reivindicação 12, em que o hidrolisato de açúcar é obtido por pré-tratamento do estoque de alimentação lignocelulósico com ácido ou álcali para produzir um estoque de alimentação pré-tratado.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, em que o pré-tratamento é com um ácido mineral.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-19, em que durante referida exposição, o pH é maior do que cerca de 1, porém menor do que 2,5.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-20, em que durante a referida exposição, o ácido é adicionado antes ao dióxido de cloro.

22. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que na etapa de introdução, a levedura no referido sistema de fermentação é exposta a dióxido de cloro a um pH de menor do que 3,0.

23. Método para produção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar compreendendo:

- (i) fermentação do hidrolisato de açúcar em um sistema de fermentação com levedura para produzir um caldo de fermentação compreendendo um produto de fermentação;
- (ii) introdução de ácido e um oxidante ao referido sistema de fermentação de modo a expor quaisquer contaminantes microbiais no referido sistema de fermentação em um ou mais estágios ao oxidante a um pH menor do que 3,0; e

(iii) recuperação do produto de fermentação.

24. Método para produção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar compreendendo:

- 5 (i) fermentação do hidrolisato de açúcar em um sistema de fermentação com levedura para produzir um caldo de fermentação compreendendo um produto de fermentação;
- (ii) introdução continuamente de ácido e um oxidante no referido sistema de fermentação de modo a expor continuamente contaminantes microbiais no referido sistema de fermentação em um ou mais estágios ao oxidante a um pH de menos do que 3,0; e
- 10 (iii) recuperação do produto de fermentação.

25. Método, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, em que, na etapa de introdução, a levedura no referido sistema de fermentação é exposta a dióxido de cloro a um pH de menos do que 3,0.

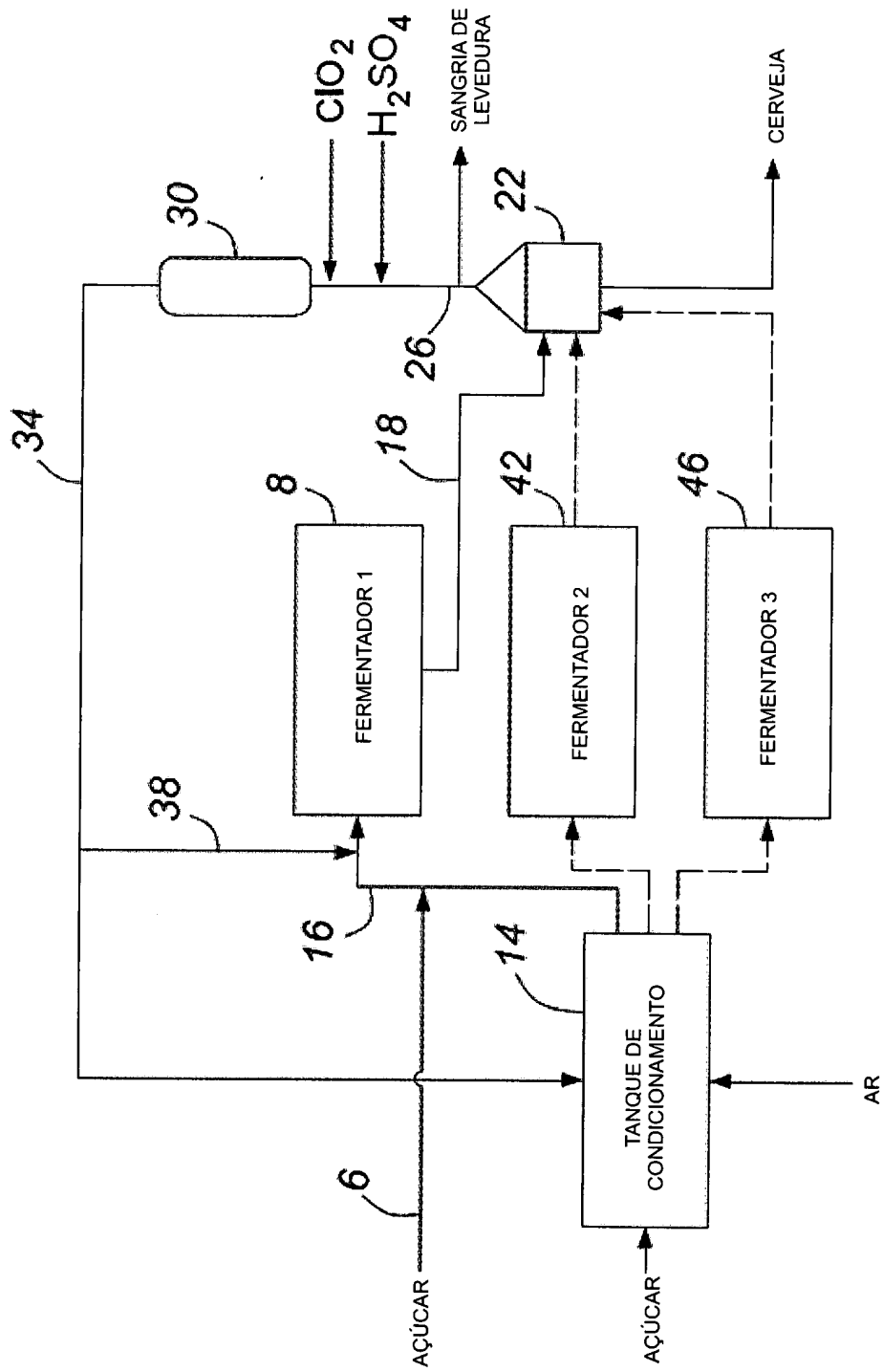


FIG. 1

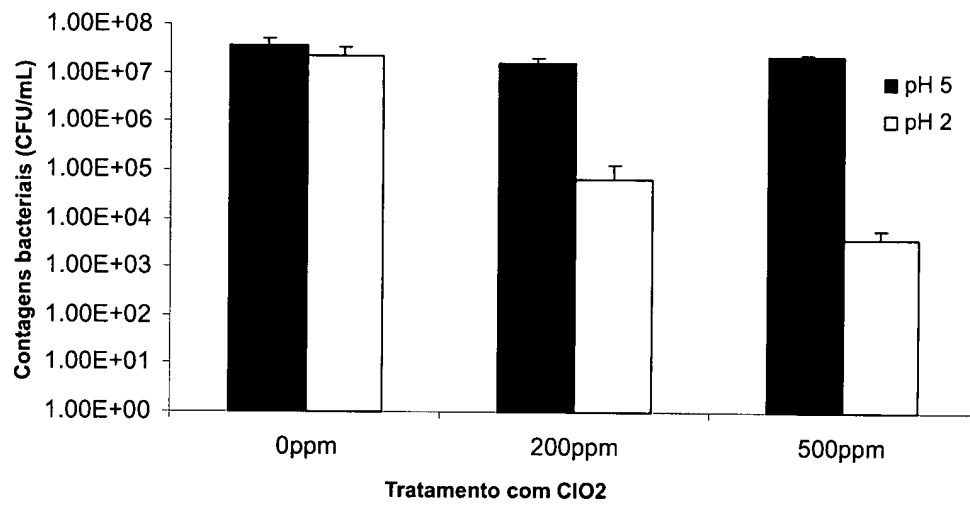


FIG. 2

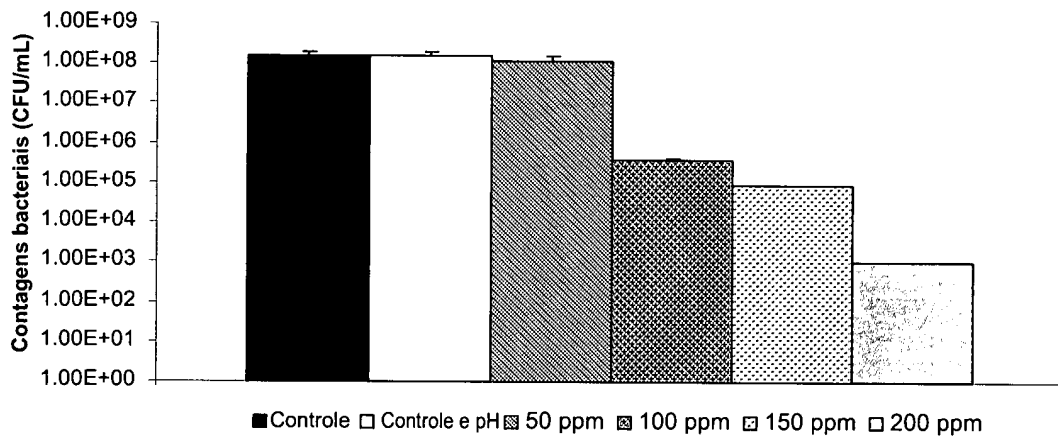


FIG. 3

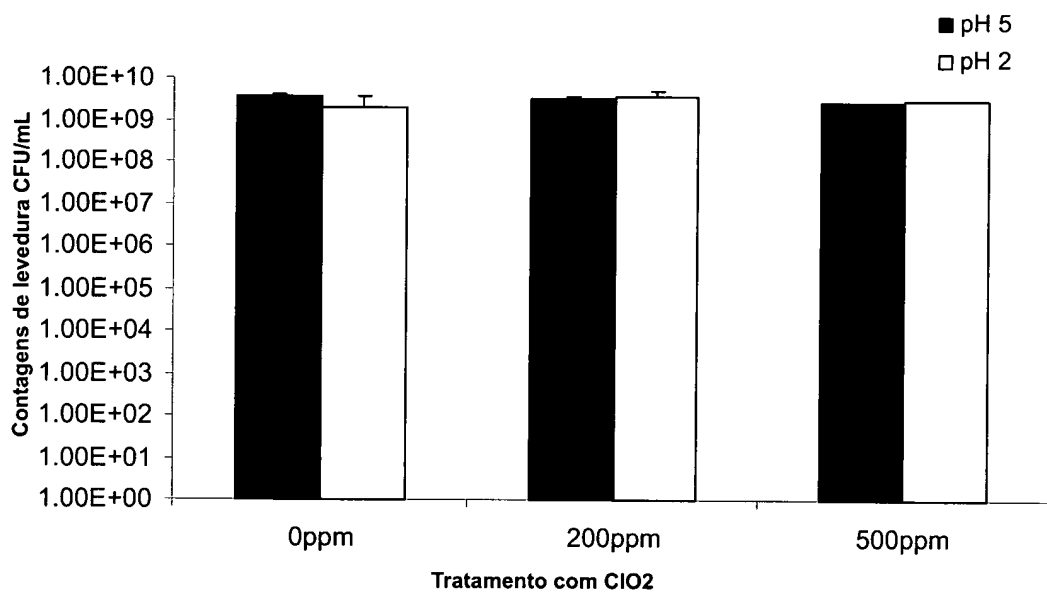


FIG. 4

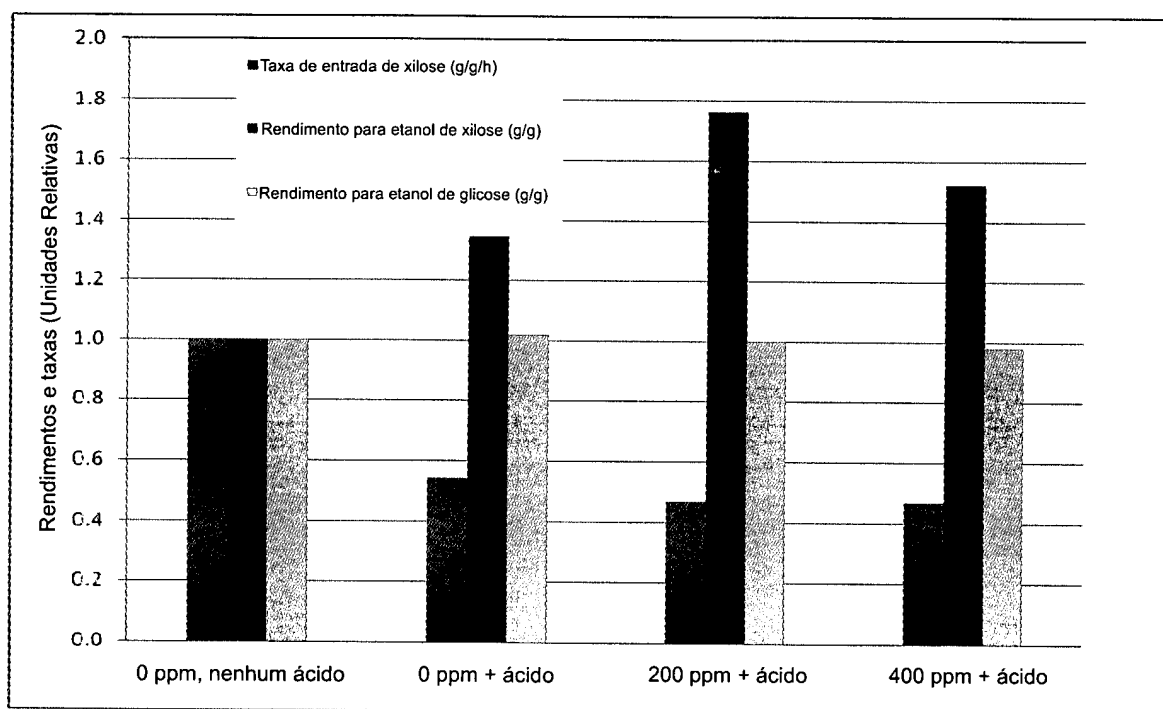


FIG. 5

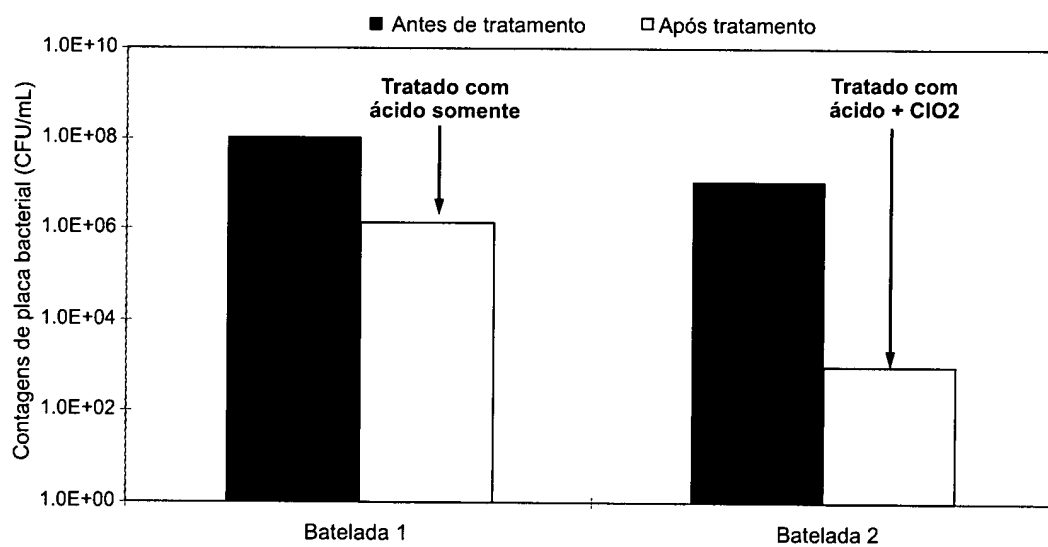


FIG. 6

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO A PARTIR DE UM HIDROLISATO DE AÇÚCAR"**.

5 A presente invenção refere-se a um método para produção de um produto de fermentação de um hidrolisato de açúcar. O método compreende fermentação do hidrolisato de açúcar em um sistema de fermentação com levedura para produzir um caldo de fermentação compreendendo um produto de fermentação; introdução de ácido e um oxidante, tal como dióxido de cloro, ao sistema de fermentação de modo a expor contaminantes micro-
10 biais no sistema de fermentação em um ou mais estágios a dióxido de cloro e um pH menor do que 3,0; e recuperação do produto de fermentação. Em um exemplo da invenção, uma pasta fluida de levedura obtida de uma etapa de reciclo de levedura é tratada com ácido e o oxidante.