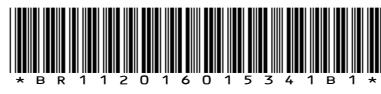




República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112016015341-3 B1



(22) Data do Depósito: 30/12/2014

(45) Data de Concessão: 20/12/2022

(54) Título: CEPAS DE LEVEDURA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO

(51) Int.Cl.: C12N 1/18; C12P 7/06; C12R 1/865.

(30) Prioridade Unionista: 30/12/2013 FR 13 63672.

(73) Titular(es): LESAFFRE ET COMPAGNIE.

(72) Inventor(es): JEAN-MICHEL BAVOUZET; ANNE-DOMINIQUE QUIPOURT; ANNIE TBAIKHI.

(86) Pedido PCT: PCT FR2014053575 de 30/12/2014

(87) Publicação PCT: WO 2015/101753 de 09/07/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/06/2016

(57) Resumo: CEPAS DE LEVEDURA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO. A presente invenção se refere a cepas de leveduras que têm propriedades melhoradas em relação às cepas especializadas que são usadas na produção de etanol de primeira geração. Em particular, as cepas da presente invenção possuem um maior rendimento de etanol, uma menor produção de glicerol e produção de etanol cinético que são semelhantes ou ligeiramente mais lento do que a cepa padrão D1B. A presente invenção também se refere às leveduras obtidas por cultura das referidas cepas, e a utilização das referidas leveduras e / ou das referidas cepas na produção industrial de etanol.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"CEPAS DE LEVEDURA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO".**

CAMPO DE INVENÇÃO

[0001] A presente invenção se refere a cepas de leveduras que produzem etanol de primeira geração, de leveduras obtidas por cultura destas cepas, e aos processos para a produção industrial de etanol a partir das referidas leveduras. Mais especialmente, a presente invenção se refere a três cepas específicas que exibem um forte tolerância ao etanol, uma menor produção de glicerol do que as cepas mais eficazes atualmente utilizadas nos processos de produção de etanol, e com um rendimento elevado de etanol. As cepas da presente invenção também têm uma rápida cinética de produção de etanol.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] A diminuição dos recursos energéticos não renováveis e da crescente preocupação em face do aumento das emissões de gases de efeito estufa são responsáveis pela necessidade de encontrar fontes de energia que são alternativas aos combustíveis fósseis (petróleo, carvão, gás). Biomassa vegetal proveniente de florestas e / ou de produtos agrícolas ou de processamento de alimentos e / ou co-produtos constitui uma fonte considerável de carbono para a produção de moléculas de interesse industrial. O etanol produzido a partir dos açúcares fermentáveis contidos em

plantas é usado em veículos que têm motores de combustão. Assim, a produção de bioetanol tem experimentado um rápido desenvolvimento nos últimos anos na América do Norte e na Europa. Em 2008, mais de 56 bilhões de litros de etanol foram produzidos em todo o mundo a partir da biomassa vegetal.

[0003] Bioetanol de primeira geração é produzido por fermentação de hexoses (açúcares compreendendo seis carbonos) contidos na biomassa rica em amido (grãos de milho, cevada, trigo, mandioca, tubérculos de batata, etc.) ou em sacarose (açúcar de cana, açúcar de beterraba, sorgo doce, etc.), ao passo que o bioetanol "de segunda geração" é produzido pela conversão da celulose e da hemicelulose contidas em resíduos agrícolas como palhas de cereais ou palha de milho, resíduos florestais, madeira, culturas energéticas, tais como *switchgrass* ou bosques com uma rotação curta ou muito curta (por exemplo, álamo).

[0004] Os processos para a obtenção dos meios de fermentação de açúcares ricos em processos de primeira geração são relativamente simples e bem controlados. No caso de plantas doces, como cana-de-açúcar, sorgo doce ou beterraba, a planta é moída ou cortada em pedaços e um suco açucarado é obtido diretamente ou após imersão em água. A fermentação alcoólica pode ser realizada utilizando o sumo bruto obtido, usando o sumo concentrado ou usando sumos concentrados, tais como melaço obtido após extração de uma

fração dos açúcares inicialmente presentes. No caso das frações de plantas ricas em amido, tais como grãos de milho, o amido deve primeiro ser hidrolizado em glicose que a levedura pode então ser convertido em etanol. O processo de hidrólise padrão é constituído por uma primeira fase durante a qual as cadeias de amido são convertidas em cadeias mais curtas através da ação de uma alfa-amilase, seguido por uma etapa de fermentação "SSF" (sacarificação e fermentação simultânea) durante o qual as dextrinas são hidrolisadas pela adição de glucosidases e durante o qual a glicose é fermentada em etanol pela levedura. Alguns processos, denominados processos frios, executam uma hidrólise do amido reduzida, ou mesmo hidrólise do amido inexistente, antes da etapa de fermentação. No caso de etanol de segunda geração produzido a partir de material lignocelulósico, os processos de hidrólise química e enzimática são muito mais complexo e trabalhoso, uma vez que o material lignocelulósico é constituído por uma matriz rígida que é difícil para desestruturar, a fim de libertar a celulose e a hemicelulose a partir da lignina. A hidrólise de materiais lignocelulósicos gera hidrolisados contendo hexoses e / ou pentoses. Qualquer que seja a biomassa utilizada ou o produto utilizado, o produto final é o mesmo, apenas difere dos processos de produção

[0005] Na Europa, o açúcar da beterraba e de cereais

(trigo, cevada, milho) são os principais meios utilizados para a produção de etanol de origem agrícola. Os açúcares (glicose, frutose ou sacarose) contidos em plantas doces (beterraba sacarina, cana-de-açúcar) e plantas em amido (cereais, como o trigo ou milho) são convertidos em álcool por um processo de fermentação industrial utilizando leveduras. O álcool é então destilado e desidratado, de modo a obter o bioetanol. Os co-produtos obtidos durante o processo de produção (grãos gastos e polpas) são destinados à alimentação animal.

[0006] As leveduras utilizadas pelos produtores de etanol de primeira geração são, principalmente, leveduras especializadas que tornam possível otimizar a rentabilidade do processo de produção. Estas leveduras são, entre outros: Etanol Red® (Fermentis®), Thermosacc® (Lallemand®), Angel Super Alcohol® (Angel®) e Fali® (AB Mauri®). As qualidades esperadas destas leveduras são a sua capacidade para produzir rapidamente altas concentrações de etanol e de esgotar os açúcares de meios de fermentação sobre o representante da temperatura e intervalos de pH de condições industriais. Estas qualidades são de particular interesse em processos que utilizam cereais, milho, em particular, que geram hidrolisados com altas concentrações de açúcar. Com efeito, os produtores ajustam o teor de açúcar do seu meio de fermentação, de modo que seja tão alto quanto possível e, ao

mesmo tempo, asseguram que o açúcar seja convertido em etanol tão rapidamente e completamente quanto possível. Assim como os produtores quer a levedura para converter todos os açúcares de a forma de etanol, que também quer o rendimento global da conversão dos açúcares consumida para etanol a ser tão elevada quanto possível e, por conseguinte, menor número de coprodutos, tais como glicerol a ser gerado durante a fermentação.

[0007] Tendo uma levedura apresentando uma melhor tolerância ao etanol e tendo uma levedura produzindo menos de glicerol e, ao mesmo tempo garantindo uma produtividade, em termos de volume que seja equivalente ou superior, tanto em condições usuais de fermentação e durante as flutuações nos parâmetros de fermentação permitiria que os produtores de etanol a aumentar a rentabilidade das suas instalações, aumentando a produção de etanol. Há, portanto, ainda uma necessidade de dispor de novas cepas melhoradas de levedura para a produção de etanol de primeira geração.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0008] A presente invenção se refere a cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* que tenham propriedades melhoradas em comparação com as cepas de levedura especializadas comumente utilizadas na produção de etanol de primeira geração.

[0009] Assim, em particular, uma matéria da presente

invenção é a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* 53-137 que foi depositada em 25 de julho, 2013, no CNCM (Coleção Nacional de Culturas de Micro-organismo [French National Collection of Microorganism Cultures] do Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris, Cedex 15) sob o número de acesso I-4791 sob as condições do Tratado de Budapeste.

[0010] Outra matéria da presente invenção é a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* 53-005, a qual foi depositada em 25 de julho de 2013 no CNCM (Coleção Nacional de Culturas de Micro-organismos [French National Collection of Microorganism Cultures] do Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris, Cedex 15) sob o número de acesso I-4790 sob as condições do Tratado de Budapeste.

[0011] Outra matéria da presente invenção é a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* 53-214, a qual foi depositada em 25 de julho de 2013 na CNCM (Coleção Nacional de Culturas de Micro-organismes [French National Collection of Microorganism Cultures] do Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris, Cedex 15) sob o número de acesso I-4792 sob as condições do Tratado de Budapeste.

[0012] A presente invenção também se refere a uma levedura obtida por cultura de uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* escolhida a partir da cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* que foi depositado em 25 de julho, 2013, no CNCM sob o número de acesso I-4791, a cepa de

levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que foi depositada em 25 de julho de 2013, no CNCM sob o número de acesso I-4790 e a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* que foi depositada em 25 de julho de 2013, no CNCM sob o número de acesso I-4792.

[0013] Um objetivo da presente invenção é também a utilização de uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* escolhida a partir da cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* que foi depositado em 25 de julho de 2013, no CNCM sob o número de acesso I-4791, a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que foi depositado em 25 de julho de 2013, no CNCM sob o número de acesso I-4790 e a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que foi depositada em 25 de julho de 2013, no CNCM sob o número de acesso I-4792, ou de uma levedura obtida por cultura de uma destas cepas para a produção de etanol de primeira geração a partir da biomassa.

[0014] Um objetivo da presente invenção é também um método para a produção de etanol de primeira geração a partir de biomassa, que compreende uma etapa de fermentação que utiliza uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* escolhida a partir da cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* que foi depositado em 25 de julho de 2013, no CNCM sob o número de acesso I-4791, a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que foi depositado em 25 de julho de 2013 no CNCM sob o número de acesso I-4790 e a cepa de

levedura *Saccharomyces cerevisiae* que foi depositada em 25 de julho de 2013 no CNCM sob o número de acesso I-4792 ou um levedura obtida por cultura de uma destas cepas.

[0015] Em algumas concretizações, a biomassa rica em açúcar e / ou amido é escolhida a partir de, ou originada, em particular, a partir de, milho, trigo, cevada, centeio, sorgo, mandioca, triticale, batata, batata-doce, cana de açúcar, beterraba sacarina e sorgo doce.

[0016] Em algumas concretizações preferidas, a biomassa é escolhida a partir de ou se origina a partir de milho, trigo, cevada, mandioca, beterraba e cana-de-açúcar.

[0017] Um objetivo da presente invenção é também a produção de borras de cerveja e borras de cerveja suplementadas com materiais solúveis a partir de resíduos de fermentação obtidas durante os processos de produção de etanol.

[0018] Uma descrição mais detalhada de algumas concretizações preferenciais da invenção é dada abaixo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0019] Como mencionado acima, a presente invenção se refere a três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que são úteis para a produção de etanol de primeira-geração. As três cepas da presente invenção foram obtidas por meio de um programa de hibridação e seleção. Elas resultam da hibridação entre a cepa de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* depositada no

CNCM em 4 de setembro de 2008, sob o número de acesso I-4072, uma cepa pertencente ao requerente, e o segundo clone de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* depositado no CNCM em 26 de junho de 2013, sob número de acesso I-4782, que também pertence ao requerente.

[0020] A cepa de levedura I-4072 é uma cepa selecionada pelo Requerente como tendo a mais forte tolerância ao etanol entre um painel de 21 amostras avaliadas.

[0021] Os clones de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* I-4782 foram selecionados pelo requerente como tendo uma tolerância ao etanol que é alta apesar de ser menor do que a da cepa I-4072, mas como tendo uma produção de glicerol inferior do que a da cepa I-4072.

[0022] O programa de seleção de híbridos conduziu a três cepas da presente invenção. Cada uma destas cepas constitui uma alternativa para as cepas especializadas mais eficazes que são atualmente utilizadas na produção industrial de etanol de primeira geração. De fato, as três cepas da presente invenção têm uma maior tolerância ao etanol, do que a cepa de referência I-4072 e ao mesmo tempo a produção de etanol de primeira geração com um rendimento mais elevado do que ao da cepa I-4072, devido a uma menor produção de glicerol, que é um subproduto da reação de fermentação. Esta boa tolerância é observada qualquer que seja a temperatura

(32° C, 35° C ou 38° C), o pH (4,0, 5,0 ou 5,5) e o fornecimento de nitrogênio inorgânico (150 a 500 ppm) durante a fermentação, o que as torna cepas que são particularmente adequadas para a produção de etanol de primeira geração em que as flutuações nos parâmetros de fermentação são comuns. Além disso, as cepas da presente invenção têm a vantagem de ter uma cinética de produção de etanol que são semelhantes ou ligeiramente inferiores às da cepa de referência I-4072.

[0023] A invenção também se refere a uma levedura obtida por cultura de uma das cepas da presente invenção. Os processos para a cultura de uma cepa de levedura são conhecidos no estado da técnica, e os técnicos versados no assunto sabem como otimizar as condições de cultura de cada cepa em função da sua natureza.

[0024] As cepas de levedura da presente invenção e as leveduras obtidas por cultura destas cepas são de utilização na produção de etanol de primeira geração a partir da biomassa. O termo "biomassa" pretende significar aqui qualquer matéria orgânica de origem vegetal, que pode tornar-se uma fonte de energia após a conversão. De um modo preferido, no contexto da invenção, a biomassa é derivada a partir de produtos agrícolas ou de processamento de alimentos e / ou coprodutos. Em particular, a biomassa é, preferencialmente, rica em sacarose ou amido, e é escolhida a partir de, ou é derivada de, por exemplo, milho, trigo,

cevada, centeio, sorgo, mandioca, triticale, batata, batata-doce, cana-de-açúcar, beterraba e de sorgo doce.

[0025] Em algumas concretizações preferidas, a biomassa é escolhida a partir de, ou é derivado de, de milho, de trigo, de cevada ou de mandioca.

[0026] Os métodos para a produção de etanol de primeira geração a partir de biomassa e a utilização de leveduras na etapa de fermentação são conhecidos no estado da técnica. O método industrial mais comum faz uso de tratamentos bioquímicos, físicos e químicos e que em última análise visam permitir a fermentação de açúcares e a produção de etanol. Diversas variantes deste método existem e são conhecidos dos técnicos versados no assunto. As cepas de levedura da presente invenção e as leveduras obtidas por cultura destas cepas podem ser utilizadas em qualquer método para a produção de etanol de primeira-geração.

[0027] A invenção aplica-se, particularmente, à produção de etanol como combustível, mas também para a produção de etanol para a indústria alimentícia, química, farmacêutica e cosmética.

[0028] A menos que sejam definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados no relatório descritivo têm o mesmo significado que o normalmente entendido por um técnico versado no assunto no campo a que esta invenção pertence. Do mesmo modo, todas as

publicações, pedidos de patentes, todas as patentes e todas as outras referências aqui mencionadas são incorporados a título de referência.

EXEMPLOS

[0029] Os exemplos abaixo descrevem algumas concretizações da presente invenção. No entanto, entende-se que os exemplos e as figuras são apresentados apenas a título de ilustração e não limitam de qualquer forma o escopo da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0030] A Figura 1 mostra as concentrações finais no final dos ensaios de fermentação realizados em meios de fermentação liquefeito de acordo com o exemplo 1. Concentração de (A) de etanol e a concentração (B) de glicerol. O meio A, B e C são descritos na tabela 1.

[0031] A Figura 2 mostra a cinética de produção de etanol por parte da cepa I 4072 (A) e dos híbridos I-4790 (B), I-4791 (C) e I-4792 (D) sob várias condições de fermentação.

Exemplo 1: Seleção das linhagens parentais para cruzar com a cepa I-4072

[0032] Um painel de 21 cepas ou clones foram testados durante a fermentação alcoólica. Os testes foram realizados em condições de fermentação e sacarificação (SSF) simultâneas e com um excesso de açúcares em relação às suas capacidades

para a conversão de etanol das cepas. Em primeiro lugar, foram utilizados meios sintéticos contendo dextrina de amido, com ou sem a adição de materiais solúveis dos resíduos de destilação. Em segundo lugar, meios de fermentação preparado a partir de farinha de milho, a partir de frações dos materiais solúveis, a partir de resíduos de destilação, e a partir de água do processo nas proporções indicadas na tabela abaixo foram usadas. Estes vários elementos foram obtidos a partir de uma fábrica de produção de etanol industrial de acordo com um processo de primeira-geração. A mistura à base de farinha de milho foi liquefeita usando Liquozyme™ SCDS (Novozymes) a 85° C durante 3 horas, após ajustamento do pH para 5,6. A dose para a qual Liquozyme™ foi usado foi de 0,8 ml / kg de farinha utilizada. Antes da inoculação, o pH inicial foi ajustado a 5,0 ou 4,5; várias concentrações de ureia (300, 600 e 1000 ppm de equivalentes de nitrogênio) foram adicionados, tal como indicado na tabela a seguir. Spyrizyme Ultra™ combustível (Novozymes) foi adicionado a uma dose de 0,6 ml / kg de farinha. A temperatura de fermentação foi regulada a 32° C. As cepas foram propagadas de antemão em meio sintético rico em 500 ml frascos defetores (de propagação microaerada).

Tabela 1.

Meio	A	B	C
pH inicial	pH 4.5	pH 5.0	pH 4.5

Temperatura (°C)	32	32	32
Farinha (g)	362,5	362,5	362,5
Materiais solúveis a partir de resíduos de destilação(g)	300	250	300
Ureia (ppm)	300	600	1000
Agua processual	QS 1 kg	QS 1 kg	QS 1 kg

[0033] Entre as diversas cepas testadas, a cepa depositada no CNCM sob o número de acesso I-4072 foi aceita como sendo, entre todas as cepas testadas, a cepa produtora da maior parte do etanol. Entre as diversas cepas testadas, a cepa I-4782 foi aceita como sendo uma cepa de produção de grandes quantidades de etanol, embora menos do que I-4072, e como a produção de quantidades menores de glicerol do que a cepa I-4072.

[0034] É interessante notar que a cinética de produção de etanol do clone I-4782 é muito lenta em comparação com as da cepa I-4072. As concentrações finais de etanol e de glicerol, que foram obtidos durante os testes são mostrados nas figuras 1A e 1B.

[0035] O objetivo era, por conseguinte, obter, por hibridação, pelo menos, um híbrido tendo uma tolerância ao etanol maior do que a da cepa I-4072, uma produção de glicerol inferior do que a da cepa I-4072, e cinética de

produção de etanol, pelo menos semelhante aos da cepa I-4072.

Exemplo 2: Obtenção de novos híbridos

[0036] Uma vez que as cepas parentais tinham sido selecionadas, várias etapas técnicas de cruzamento resultando no desenvolvimento de novas cepas foram realizadas, compreendendo:

- Obtenção, por esporulação em seguida, germinação, segregantes das duas cepas originais e caracterizar seu tipo de sexo,
- Realizar cruzamentos após o estabelecimento de tabelas de cruzamento, e
- Isolar e identificar os novos híbridos.

[0037] *Selecionando os segregantes elite da cepa I-4072.* Segregantes da cepa I-4072 foram gerados e avaliados com base na sua produção de etanol. Em seguida, com base nestes resultados, 8 esporos, "alpha" Tipo de sexo e 12 esporos, "a" Tipo de sexo com os melhores níveis de desempenho de álcool foram selecionados.

[0038] *A realização de cruzamentos e obtenção de novas cepas.* A fim de obter novas cepas, várias séries de cruzes foram realizadas entre os segregantes de I-4072 e selecionados aleatoriamente segregantes escolhidos de I-4782.

[0039] *Identificação de novos híbridos.* Novos híbridos foram identificados por PCR tipo de acasalamento.

[0040] Foram identificadas numerosas cepas que foram

assim criados e validado no final dos cruzamentos efetuados. Entre os híbridos, I-4791, I-4790 e I-4792, que são matéria da presente invenção, em particular se destacam, como indicado posteriormente.

Exemplo 3: Seleção dos novos híbridos.

[0041] A fim de ser capaz de selecionar os melhores híbridos entre as 292 cepas recentemente criadas, foram desenvolvidos quatro níveis de seleção. Estas seleções estão baseadas sobre o controle de perda de massa dos meios de álcool de fermentação após a inoculação com as cepas a ser estudado, em comparação com o controle I-4072, e a medição da concentração de etanol, do restante da glicose e do glicerol produzida após 72 horas de fermentação a diferentes temperaturas (35° C e 38° C). Os meios de fermentação utilizados foram meios sintéticos contendo uma alta concentração de glicose, acima das capacidades de conversão para o etanol das cepas testadas. Os critérios de seleção são melhores cinéticas de perda de massa do que a cepa I-4072 e / ou diminuição da produção de glicerol em comparação com a cepa I-4072. A perda de massa é um indicador indireto da produção de etanol pelas leveduras, de acordo com a equação estequiométrica: 1 mol de glicose \rightarrow 2 mol CO₂ + 2 mol de etanol, que faz com que seja possível ligar globalmente a massa de perda de massa do meio no forma de CO₂ produzido e evaporou-se para a massa de etanol produzido.

[0042] No final, de 292 cepas, foram selecionados 18 híbridos, incluindo as cepas I-4790, I-4791 e I-4792. Estas cepas foram escolhidas porque possuem as seguintes características:

[0043] - Híbrido I-4790: a temperaturas de 35° C e 38° C, para uma produção de etanol equivalente à da cepa I-4072, a produção de glicerol é reduzido em 15 a 20%. A cinética de perda de massa são no entanto mais baixo do que as da cepa I-4072;

[0044] - Híbrido I-4791: a temperaturas de 35° C e 38° C, a produção de etanol é aumentada em 3,5% em comparação com a da cepa I-4072, a cinética de perda-em massa são mais rápidos do que aqueles de I- 4072 cepa, e a produção de glicerol é equivalente à da cepa I-4072;

[0045] - Híbrido I-4792: a temperaturas de 35° C e 38° C, a produção de etanol é equivalente ao de I 4072 (com uma ligeira melhoria, a 38° C), a cinética de perda de massa são equivalentes às de I-4072, e a produção de glicerol é de 7,5 a 8% mais baixa em comparação com a de I-4072.

Exemplo 4: Produção de etanol a partir de farinha de milho pelos híbridos com excesso de açúcares no meio.

[0046] Os testes foram realizados em meio à base de farinha de milho e a fracção de materiais solúveis a partir de resíduos de destilação industriais. Os testes foram realizados em diferentes temperaturas de fermentação, com

várias adições de nitrogênio e a vários valores de pH iniciais. As características que foram estudados são: a tolerância máxima das cepas de etanol, a produção de glicerol e a cinética de produção de etanol.

[0047] As perdas de massa dos meios de fermentação foram medidas ao longo do tempo. Uma vez que a estabilização da perda de massa tinha sido alcançado, a amostragem do meio de fermentação foi levada a cabo e um ensaio por HPLC das concentrações de etanol e de glicerol foi realizado. As massas de etanol e glicerol produzido foram calculados a partir da concentração medida e a partir da massa de fermentação deve no momento da amostragem, a fim de realizar o ensaio e a concentração inicial e os valores de massa.

[0048] Protocolo. Os meios de fermentação foram preparados a partir de farinha de milho, fracções dos materiais solúveis a partir de resíduos de destilação e água de processo. A fim de simular o mais próximo possível as condições de produção industriais, estes diferentes elementos são obtidos a partir de fábricas de produção de etanol industrial de acordo com processos de primeira geração. As proporções dos três componentes industriais foram: farinha de milho (36% p / p), fração dos materiais solúveis a partir de resíduos de destilação (35% p / p) e de água do processo (29% p / p). A mistura foi liquefeita usando LiquozymeTM SCDS (Novozymes) a 85° C durante 3 horas, após o ajuste do pH para

5,6. A dose utilizada foi Liquozyme™ 0,8 ml / kg de farinha utilizada. Antes da inoculação, o pH foi ajustado para 5 ou 4 (de acordo com a tabela), e adicionaram-se várias concentrações de ureia (150, 250 e 500 ppm de equivalentes de nitrogênio). Sprizyme Ultra™ combustível (Novozymes) foi adicionado a uma dose de 0,6 ml / kg de farinha. As cepas foram propagadas de antemão em meio sintético rico em 500 ml frascos refletores (de propagação microaerada). Um creme de levedura foi preparado a partir do meio de propagação por centrifugação e ressuspensão do sedimento de centrifugação em água. O teor de sólidos do creme de levedura foi determinado e o meio de fermentação inoculou-se com o creme de modo a ter um nível de inoculação de 0,5 g de fermento seco equivalente / kg de meio.

[0049] Os testes realizados. A tabela a seguir apresenta as condições dos testes de fermentação realizados e das cepas utilizadas.

Tabela 2. As condições de ensaio de fermentação.

Testes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Condições															
Meio	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B
T (°C)	3	3	3	3	3	3	3	3	32	32	35	35	38	38	38
	2	5	8	5	5	5	5	5							
N (ppm)	5	5	5	1	2	5	1	2	5	50	50	50	50	50	50
	0	0	0	5	5	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0

	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
pH	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	4		
Cepas testadas																
I-4072	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
I-4790	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
I-4791	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
I-4792						x			x	x	x	x	x	x	x	x

A: 36% de farinha de milho, 35% de materiais solúveis de resíduos de destilação, 29% de água de processo

B: 36% de farinha de milho, 35% de materiais solúveis de resíduos de destilação, 29% de água de processo

N: fornecimento de nitrogênio

Resultados. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas abaixo.

Tabelas 3 a 4. Concentrações finais de etanol e de glicerol e massas de etanol e de glicerol produzido nos testes 1 - 9.

Tabela 3

Cepa	Concentrações finais (g/kg)			Massa produzida (g/kg de meio usado)		
	Equiv. glicose	Glicerol	Etanol	Glicerol	Etanol	
Test 1: 32°C, 500 ppm N, pH 5						
I-4072	40, 9		7, 9	121, 3	5, 3	107, 6
I-4790	35, 4		7, 5	123, 9	4, 8	109, 3

I-4791	37,1	8,4	129,6	5,7	114,8
Test 2: 35°C, 500 ppm N, pH 5					
I-4072	37,7	6,7	110,5	5,0	98,9
I-4790	28,7	6,2	116,4	4,5	103,8
I-4791	32,7	6,5	111,5	4,8	99,7
Test 3: 38°C, 500 ppm N, pH 5					
I-4072	75,6	6,4	90,3	4,8	82,3
I-4790	74,0	5,5	93,5	4,0	85,2
I-4791	72,1	6,3	93,4	4,6	85,0
Test 4: 150 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	46,2	15,9	109,9	8,5	98,6
I-4790	26,6	14,8	116,1	7,4	103,4
I-4791	34,4	15,5	113,5	8,1	101,3
Test 5: 250 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	27,9	15,9	108,2	8,5	96,4
I-4790	20,5	15,3	117,7	7,9	104,4
I-4791	26,6	15,3	112,3	8,0	99,8
Test 6: 500 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	15,9	15,7	117,4	8,3	104,2
I-4790	11,4	14,8	122,0	7,4	108,0
I-4791	16,0	15,0	119,9	7,7	106,4
I-4792	11,2	15,4	122,4	8,0	108,4
Test 7: 150 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	27,8	15,9	103,9	9,0	93,4
I-4790	17,1	15,2	111,1	7,9	99,5

I-4791	23,1	15,9	108,2	8,6	97,1
Test 8: 250 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	35,2	16,3	114,9	9,0	102,6
I-4790	22,6	15,5	122,1	8,1	108,4
I-4791	30,6	15,2	117,5	7,9	104,6
Test 9: 500 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	28,4	15,8	123,2	8,2	109,2
I-4790	18,6	15,3	128,1	7,7	113,3
I-4791	22,5	14,8	122,5	7,4	108,6
I-4792	17,3	15,1	125,5	7,6	111,0

Tabela 4.

Cepa	Concentrações finais (g/kg)		Equiv. glicose	Massa produzida (g/kg de meio usado)	
	Glicerol	Etanol		Equiv. glicose	
Test 11: 32°C, 500 ppm N, pH 4					

I-4072	35,4	15,0	117,1	13,4	104,2
I-4790	27,0	14,4	122,9	12,8	109,0
I-4791	35,5	14,6	117,7	13,0	104,9
I-4792	26,9	14,4	122,9	12,7	108,9

Test 10: **32°C, 500 ppm N, pH 5**

I-4072	18,5	16,2	127,3	14,3	112,2
I-4790	16,2	15,1	129,5	13,3	114,1
I-4791	22,5	15,5	126,2	13,7	111,3

I-4792	15,3	15,3	130,3	13,4	114,6
Test 13: 35°C, 500 ppm N, pH 4					
I-4072	46,4	15,1	105,5	13,6	94,7
I-4790	33,8	14,5	117,6	12,9	104,7
I-4791	46,0	14,8	110,6	13,1	98,5
I-4792	37,3	14,9	114,8	13,3	102,4
Test 12: 35°C, 500 ppm N, pH 5					
I-4072	31,6	16,5	117,4	14,7	1044
I-4790	30,5	15,4	119,9	13,7	106,6
I-4791	31,7	15,7	117,7	14,0	104,7
I-4792	27,2	15,9	121,2	14,1	107,6
Test 15: 38°C, 500 ppm N, pH 4					
I-4072	82,7	14,1	87,7	12,9	80,2
I-4790	80,3	13,1	85,8	11,9	78,4
I-4791	80,9	12,9	88,1	11,8	80,5
I-4792	82,7	13,5	86,4	123	78,9
Test 14: 38°C, 500 ppm N, pH 5					
I-4072	72,7	14,8	93,4	13,5	84,8
I-4790	76,0	13,8	92,2	12,5	83,9
I-4791	76,8	14,3	92,1	13,0	83,8
I-4792	75,8	14,070	93,375	12,8	84,9

[0050] Estes resultados mostram claramente que os híbridos têm uma melhor tolerância ao etanol do que a cepa I-4072 de partida (que apresenta uma vantagem de 2 a 3% através da cepa I-4072) e que produzem menos glicerol do que a cepa

I-4072. Esta produção mais baixa de glicerol pelas cepas I-4790, I-4791 e I-4792 deve logicamente conduzir a um melhor rendimento de conversão dos açúcares consumida para etanol.

[0051] *Cinética de produção de etanol.* A título de exemplo, a cinética de perda de massa dos testes 10 - 13 são apresentados na figura 2.

[0052] Estes resultados mostram que a cepa I-4072 tem a cinética de produção de etanol mais rápidas de todas as cepas testadas. Entre os híbridos da invenção, o híbrido I-4791 tem uma cinética de produção de etanol, que são mais ou menos semelhantes àquelas da cepa I-4072. Por outro lado, o híbrido I-4790 apresenta a cinética mais lenta com atrasos variando até 10 horas a pH 5.

Exemplo 5: Testes para a produção de etanol a partir de farinha de milho pelos híbridos com concentrações limitantes de açúcares no meio

[0053] *Rendimento de conversão em etanol.* A fim de reforçar os resultados anteriores, vários testes foram efetuados com concentrações de farinha de milho mais baixos do que aqueles utilizados nos ensaios do Exemplo 4 e, de tal modo que as cepas possam consumir totalmente os açúcares fermentáveis do meio. Os testes realizados são apresentados na tabela 5 que se segue:

Tabela 5. As condições de fermentação.

Teste	16	17	18	19
-------	----	----	----	----

Condições				
Meio	C	D	C	D
T (°C)	32	35	32	35
N (ppm)	250	250	150	150
pH	5	5	5	5

Cepas testadas				
I-4072	x	x	x	x
I-4790	x	x	x	x
I-4791	x	x	x	x
I-4792	x	x	x	x

C: 32° C: 33% de farinha de milho, 35% de materiais solúveis a partir de resíduos de destilação, 32% água do processo

D: 35° C: 30% de farinha de milho, 35% de materiais solúveis a partir de resíduos de destilação, 35% água do processo

Os resultados são apresentados nas tabelas 6 e 7 seguintes.

Tabela 6

Cepa	Concentrações finais (g/kg)			Massa produzida (g/kg de meio usado)	
	Equiv. glicose	Glicerol	Etanol	Glicerol	Etanol
Teste 16 32°C, 150 ppm N, pH 5					
I-4072	1,6	16,9	118,7	8,3	105,3
I-4790	1,6	15,9	122,3	7,4	108,6
I-4791	1,8	17,1	121,9	8,5	108,2
I-4792	1,9	16,5	119,8	7,9	106,4

Teste 17					
35°C, 150 ppm N, pH 5					
I-4072	1,5	16,1	102,4	7,7	91,7
I-4790	1,4	14,7	107,9	6,5	96,6
I-4791	1,5	15,1	108,1	6,8	96,6
I-4792	1,4	15,0	109,6	6,7	97,9

Tabela 7.

Cepa	Concentrações finais (g/kg)			Massa produzida (g/kg de meio usado)	
	Equiv. glicose	Glicerol	Etanol	Glycerol	Etanol

Teste 18**32°C, 250 ppm N, pH 5**

I-4072	1,9	14,8	116,2	8,1	103,6
I-4790	1,5	13,9	117,1	7,2	104,4
I-4791	1,7	13,9	117,3	7,3	104,7
I-4792	1,6	14,6	116,7	7,8	104,2

Teste 19**35°C, 250 ppm N, pH 5**

I-4072	1,5	14,5	106,1	7,9	95,3
I-4790	1,4	13,0	106,5	6,5	95,9
I-4791	1,5	13,6	105,8	7,1	95,2
I-4792	1,5	13,9	103,2	7,3	92,9

[0054] Os resultados obtidos confirmam as observações feitas nos testes anteriores: os híbridos I-4790, I-4791 e I-4792 produzem significativamente menos glicerol e mais etanol do que a cepa de referência I-4072, em especial, com uma dose reduzida de nitrogênio fornecido (N).

[0055] Conclusões. Os resultados obtidos demonstram claramente que:

[0056] - O híbrido I-4791 tem: a cinética de produção de etanol que são idênticos ou semelhantes aos da I-4072, uma melhor tolerância ao etanol (+ 2%), uma menor produção de glicerol (5%), e um melhor rendimento em etanol (+ 2%);

[0057] - O híbrido I-4790 tem: uma melhor tolerância ao etanol de I-4072 (+ 3%), uma menor produção de glicerol (10%) e um rendimento de etanol melhor (+ 2%), mas a cinética de produção de etanol que são mais lentos do que os da I-4072;

[0058] - O híbrido I-4792 tem: uma melhor tolerância ao etanol de I-4072 (+ 3%), exceto sob condições adversas (38° C / pH 4), a cinética de produção de etanol semelhantes às de I-4072, uma produção menor de glicerol (5%) e um rendimento mais elevado de etanol (+ 1%).

Exemplo 6: Testes para a produção de leveduras provenientes dos três híbridos selecionados

[0059] Os híbridos selecionados foram multiplicados, em escala piloto, em condições de arejamento de acordo com um regime de descontínuo com alimentação bem conhecidas dos técnicos versados no assunto. As leveduras obtidas foram secas de acordo com as técnicas habituais. Estes testes de produção de levedura ocorreu sem qualquer problema particular que está sendo observado.

[0060] Testes de produção de etanol foram realizados utilizando as leveduras secas instantâneas produzidas com o objetivo de verificar se o processo de produção de levedura não prejudica os níveis de desempenho das cepas produzidas.

[0061] *Protocolo.* Os meios de fermentação foram preparados a partir de farinha de milho, frações dos materiais solúveis a partir de resíduos de destilação e água de processo. Estes vários elementos foram obtidos a partir de fábricas de produção industrial de etanol. As proporções dos três componentes industriais foram: farinha de milho (36% p / p), fração de materiais solúveis de destilação (35% p / p) e água (29% p / p). A mistura foi liquefeita usando Liquozyme SCDSTM (Novozymes) a 85° C durante 3 horas, após ajuste do pH para 5,6. A dose de LiquozymeTM utilizada foi de 0,8 ml / kg de farinha utilizada.

[0062] As leveduras secas produzidas a partir dos híbridos I-4790, I 4791 e I-4792 e a levedura comercial Etanol RedTM foram propagadas na forma liquefeita diluída em água (70% p / p, 30% p / p). O nível de inoculação foi de 0,5 g de fermento seco / kg de meio, o pH foi ajustado para 5, a temperatura de propagação foi de 32 ° C, e ureia (500 ppm) e Spirizyme Fuel UltraTM (0,6 ml / kg de farinha) foram adicionado. O meio de propagação foi transferido para o meio de fermentação com uma transferência de 10% peso / peso.

[0063] As fermentações foram realizadas sob as

condições descritas na Tabela 8.

Tabela 8

Testes	20	21	22	23
Condições				
Meio	B	B	B	B
T (°C)	32	35	32	35
Ureia (ppm)	500	500	300	300
pH inicia	5	5	5	5
Leveduras secas instantâneas testada				
Levedura Ethanol Red™	x	x	x	x
I-4790 Batelada 1	x	x	x	x
I-4790 Batelada 2	x	x	x	x
I-4791 Batelada 1	x	x	x	x
I-4791 Batelada 2	x	x	x	x
I-4792 Batelada 1	x	x	x	x
I-4792 Batelada 2	x	x	x	x

B: 36% de farinha de milho, 35% de materiais solúveis derivados de resíduos da destilação, 29% água do processo.

[0064] Os resultados obtidos, os quais são indicados na tabela 9, confirmam, dentro do limite da precisão dos testes efetuados, os resultados já obtidos e confirmam a possibilidade de produção e secagem das cepas I-4790, I-4791 e I-4792 .

[0065] *Conclusões.* Os resultados obtidos de acordo com a invenção tornou possível a obtenção de leveduras

industriais que têm níveis de desempenho que são significativamente melhorados em termos de produtividade e rendimento quando elas são utilizadas para a produção de etanol a partir de açúcares derivados de biomassas.

[0066] Em comparação com o produto de referência no mercado (Etanol RedTM) :

[0067] - A cepa industrial I-4790 faz com que seja possível melhorar a produtividade de etanol de + 2% com um rendimento melhorado de etanol / açúcar, em virtude da redução de 10% na quantidade de glicerol gerado;

[0068] - A cepa industrial I-4791 faz com que seja possível melhorar a produtividade de etanol de + 2% com um rendimento melhorado de etanol / açúcar em virtude da redução de 5% na quantidade de glicerol gerado;

[0069] - A cepa industrial I-4792 faz com que seja possível melhorar a produtividade de etanol por + 1% com um rendimento melhorado de etanol / açúcar em virtude da redução de 5% na quantidade de glicerol gerado.

Tabela 9.

		Concentrações finais (g/kg)			Massas produzidas (g/kg de meio usado)	
Levedura seca	Batelada	Glicose	Glicerol	Etanol	Glicero	Etano
					1	1

instantânea						
32°C, 300 ppm						
Ethanol		18,3	16,9	113,5	8,3	95,6
Red TM						
I-4791	1	10,6	16,8	118,1	8,1	99,2
I-4791	2	10,7	16,8	119,5	8,1	100,5
I-4790	1	12,1	15,8	116,8	7,3	98,4
I-4790	2	16,5	16,1	109,5	7,7	92,2
I-4792	1	16,2	16,4	112,9	7,8	95,2
I-4792	2	14,4	16,4	112,8	7,8	94,8
35°C, 300 ppm ureia						
Ethanol		33,6	16,1	103,1	7,7	86,9
Red TM						
I-4791	1	29,7	15,9	103,5	7,4	87,0
I-4791	2	33,3	15,9	101,9	7,5	85,9
I-4790	1	29,3	15,5	103,4	7,1	87,2
I-4790	2	27,9	15,5	107,8	7,1	90,9
I-4792	1	33,2	15,4	102,9	7,0	86,9
I-4792	2	38,0	15,2	99,8	6,9	84,3
32°C, 500 ppm ureia						
Ethanol		11,8	17,0	116,4	8,2	97,4
Red TM						
I-4791	1	3,4	15,8	121,2	7,0	100,7
I-4791	2	6,3	16,5	119,5	7,7	100,0
I-4790	1	4,6	16,0	112,0	7,4	93,4

I-4790	2	5, 1	16, 0	124, 0	7, 4	104, 1
I-4792	1	5, 9	16, 5	121, 3	7, 8	101, 9
I-4792	2	6, 7	16, 5	121, 9	7, 8	102, 3
<i>35°C, 500 ppm urea</i>						
Ethanol		21, 3	16, 0	116, 5	7, 5	98, 1
Red TM						
I-4791	1	19, 8	15, 8	118, 5	7, 2	99, 6
I-4791	2	19, 1	15, 9	119, 9	7, 3	101, 0
I-4790	1	19, 1	15, 2	116, 3	6, 8	97, 8
I-4790	2	19, 4	15, 0	115, 7	6, 6	97, 3
I-4792	1	20, 3	15, 6	118, 7	7, 1	100, 2
I-4792	2	20, 3	15, 8	118, 2	7, 3	99, 5

REIVINDICAÇÕES

1. Cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* **caracterizada pelo** fato de que é selecionada do grupo que consiste na cepa de levedura depositada em 25 de julho de 2013 no CNCM sob o número I-4791, a cepa de levedura depositada em 25 de julho de 2013 no CNCM sob o número I-4790, e a cepa de levedura depositada em 25 de julho de 2013 sob o número I-4792.

2. Uso de uma cepa de levedura conforme definida na reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que é para a produção de etanol de primeira geração a partir da biomassa.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que de a biomassa é rica em açúcar e/ou amido.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que a biomassa compreende ou se origina a partir de cana de açúcar, beterraba, sorgo doce, milho, trigo, cevada, centeio, sorgo, triticale, batata, batata-doce e/ou mandioca.

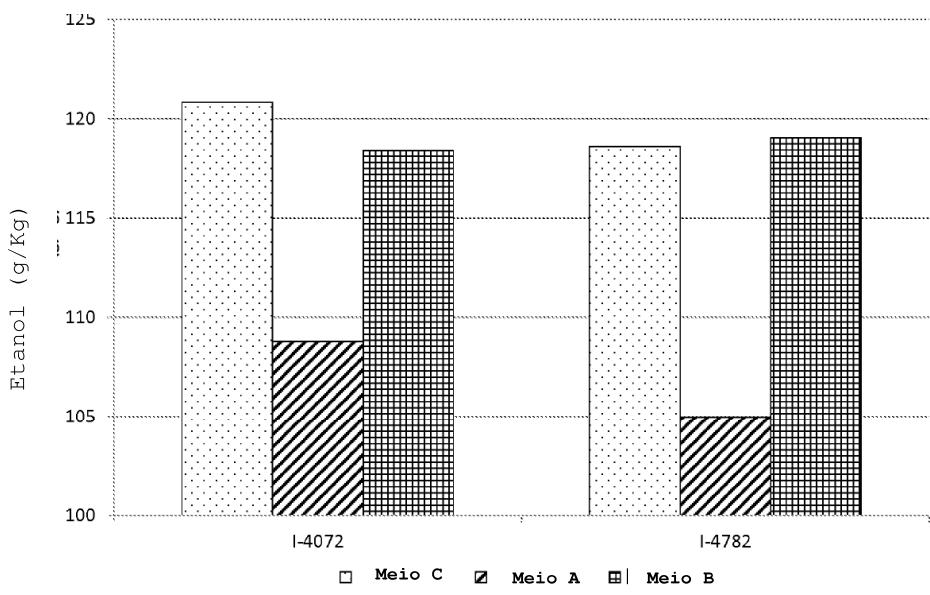
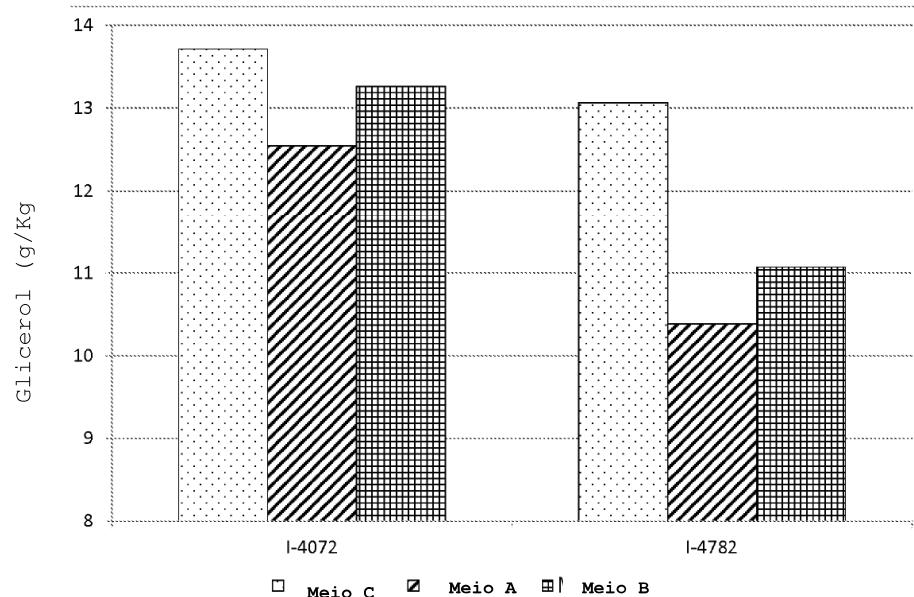
5. Processo para a produção de etanol de primeira geração a partir de biomassa **caracterizado pelo** fato de que compreende fermentar biomassa à etanol utilizando uma cepa de levedura conforme definida na reivindicação 1.

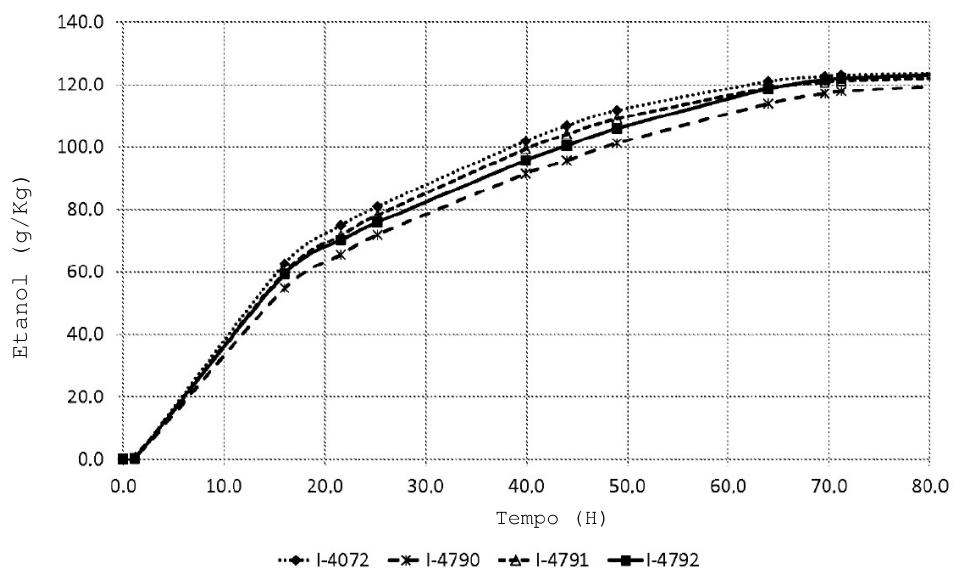
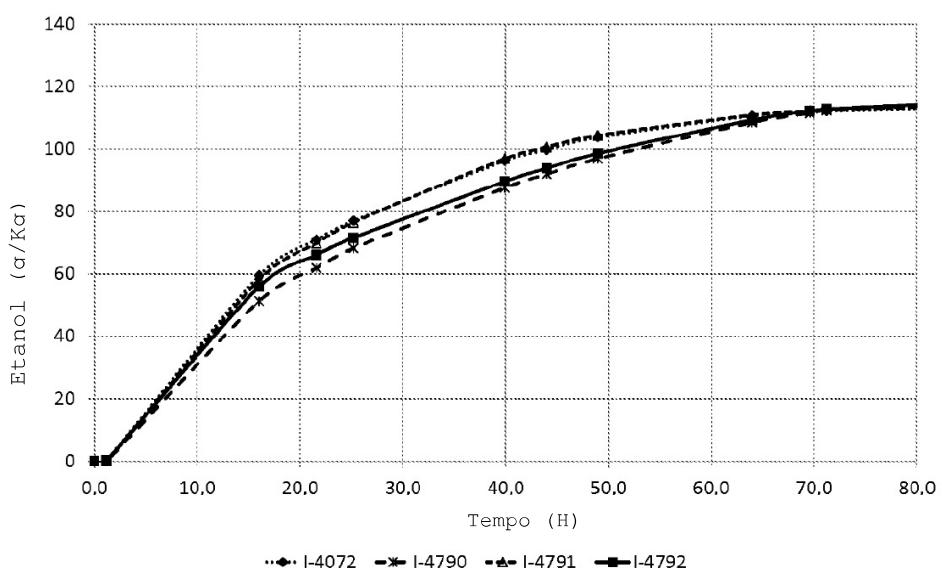
6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de que a biomassa é rica em açúcar e/ou amido.

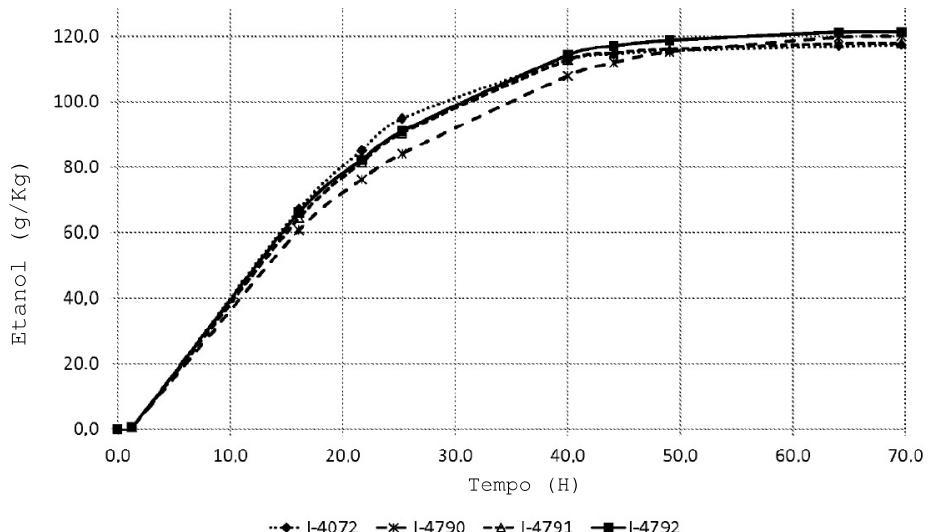
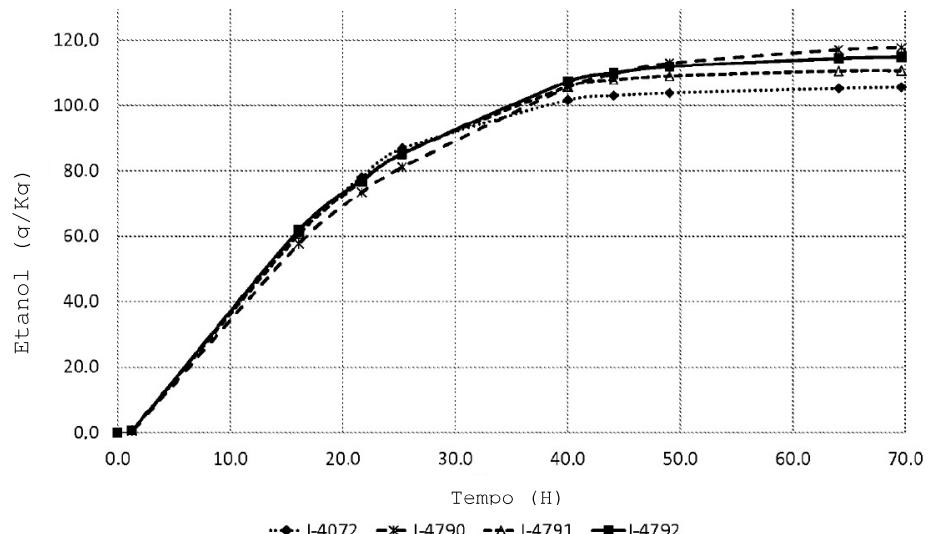
7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que a biomassa compreende cana de açúcar, beterraba, sorgo doce, milho, trigo, cevada,

centeio, sorgo, triticale, batata, batata-doce e/ou de mandioca.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de que a etapa de fermentação é realizada a uma temperatura de 32 °C a 35 °C e a pH de 5 a 5,5.

A**B****Figura 1 (A) – (B)**

A**Teste 10****B****Teste 11****Figura 2 (A) – (B)**

C**Teste 12****D****Teste 13****Figura 2 (C) – (D)**