



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

(11) BR 112013008150-3 B1

(22) Data do Depósito: 05/10/2011

(45) Data de Concessão: 26/09/2017



(54) Título: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

(51) Int.Cl.: C12P 7/10; C13K 1/02

(30) Prioridade Unionista: 13/10/2010 FR 10 58327

(73) Titular(es): COMPAGNIE INDUSTRIELLE DE LA MATIERE VEGETALE CIMV

(72) Inventor(es): MICHEL DELMAS; BOUCHRA BENJELLOUN MLAYAH

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE**".

5 A presente invenção refere-se a um processo para a produção de bioetanol ou de etanol que compreende um pré-tratamento de material em bruto de lignocelulose vegetal com a finalidade de separar a celulose e, que compreende uma hidrólise enzimática da celulose.

A requerente, CIMV, é uma companhia se especializando no tratamento de no uso econômico do material em bruto de lignocelulose vegetal.

10 A esse respeito, a requerente depositou e é proprietária de vários pedidos de patente e de patentes que se relacionam a processos para a produção de polpa de papel, ligninas, açúcares e ácido acético através do fracionamento do material de lignocelulose vegetal em um meio de ácido fórmico/ácido acético (WO-A-1 00/68494).

15 A requerente também é a proprietária de pedidos de patente e/ou de patentes que se relacionam a um processo para o tratamento prévio de um material de lignocelulose vegetal com vista à produção de bioetanol (WO-A2-2010/006840).

20 Esse processo de pré-tratamento torna possível especificamente à obtenção, a partir do material em bruto de lignocelulose vegetal (LVRM), sob condições industriais econômicas, em primeiro lugar de um substrato feito de essencialmente celulose desfibrada que exhibe condições ótimas para a sua subsequente hidrólise enzimática, e um segundo substrato feito de melaço de açúcar que se origina das hemiceluloses das quais os hidrolisados não contém furfural.

25 A requerente por esse motivo já propôs um processo para a produção do bioetanol a partir de material em bruto de lignocelulose vegetal, que compreende as etapas sucessivas de pré-tratamento do LVRM, d hidrólise enzimática do material pré-tratado e de fermentação alcoólica dos produtos que resultam da etapa de hidrólise.

30 A requerente propôs especificamente um processo para a produção de bioetanol a partir de um material em bruto de lignocelulose vegetal,

que compreende as etapas sucessivas de:

- (a) pré-tratamento do material em bruto de lignocelulose vegetal com a finalidade de separar a celulose, as hemiceluloses e a ligninas contidas no material em bruto de lignocelulose vegetal, o pré-tratamento com-

5 compreendendo as etapas sucessivas que consistem de:

• (i) desestruturar o material em bruto de lignocelulose vegetal através da colocação do mesmo na presença de uma mistura que contém ácido fórmico e água, em uma temperatura de reação entre 95°C e 110°C;

• (ii) em seguida, em pressão atmosférica e antes de qualquer
10 hidrólise em seguida a ação de fermentação, na separação:

* por um lado, da fase sólida que consiste principalmente da referida celulose capaz de em seguida ser hidrolisada e fermentada para a produção do bioetanol;

* e por outro lado, a fase líquida que contém especificamente em
15 uma solução de água, o ácido fórmico, as ligninas e as hemiceluloses;

- (b) a hidrólise enzimática da referida fase sólida;

- (c) fermentação alcoólica dos produtos que resultam a partir da referida etapa de hidrólise, que sejam capazes de serem fermentados para a produção do bioetanol.

20 Este processo está descrito de forma específica em detalhe no documento EP-2 235 154 (WO-A-1- 2009/092749), ao conteúdo do qual deve ser feita referência e que fica incorporado aqui, neste pedido de patente por meio de referência.

Este processo propõe uma abordagem que é radicalmente diferente a partir daquela da técnica precedente, através da execução de uma separação dos pré bio polímeros através de solvólise em um meio de ácido/água, que torna possível a separação de ligninas lineares, não recombinadas de baixo peso molecular com um valor alto adicionado, antes de qualquer ação de hidrólise em seguida de fermentação da celulose e das hemiceluloses.
25
30

Este processo, que torna possível serem obtidos níveis de desempenho industrial sem levar em conta a natureza dos vegetais usados, e

que é, por esse motivo especificamente vantajoso no caso das plantas anuais para abertura do caminho na direção de um novo uso econômico, especificamente no caso das palhas de cereais e do bagaço da cana de açúcar ou do bagaço do sorgo de açúcar, o referido uso econômico sendo adicionado
5 àquele já proposto pela requerente no Pedido de Patente Internacional WO-A-1 00/68494, que se refere a um processo para a produção de polpa para papel, lignina, açúcares e ácido acético através do fracionamento do material de lignocelulose vegetal em um meio de ácido fórmico/ácido acético.

Essas invenções (processos CIMV) estão direcionadas em melhorar as condições industriais para a produção de etanol ou de bioetanol a partir de LVRM, e de modo específico a hidrólise da celulose para dar açúcares que possam ser fermentados.
10

Em geral e de uma maneira conhecida, os processos para a produção de bioetanol a partir de LVRM levam em conta vários parâmetros.

Entre esses parâmetros tem sido identificados de modo específico que a lignina pode ser um inibidor de enzima e que a matriz de lignocelulose tem que ser tratada com a finalidade de tornar a celulose e a hemicelulose hidrolisáveis.
15

Em virtude da sua composição química, os polímeros de lignina são insolúveis e altamente reativos.
20

Como resultado, a presença de ligninas reforça a rede de celulose e hemiceluloses e elas prejudicam a penetração e a ação de enzimas, exigindo a presença de água.

A hidrólise enzimática da celulose é uma abordagem recomendada para serem obtidos açúcares fermentáveis a partir de várias razões, e de modo específico devido a que os resultados das avaliações econômicas são em favor de uma hidrólise enzimática quando ela é comparada com a hidrólise química.
25

Alem do mais a hidrólise enzimática gera poucos efluentes a serem tratados e nenhum problema de corrosão.
30

A hidrólise enzimática real é executada por simplesmente colocando o material dm bruto vegetal pré tratado em contato com uma solução

enzimática e assegurando ao mesmo tempo em que a suspensão seja homogênea e que as condições ótimas sejam mantidas, as referidas condições sendo, por exemplo, com relação à celulase T. resei, uma temperatura entre 45°C e 50°C e um pH de cerca de 4,8.

5 O tempo de ação da enzima depende da quantidade de enzimas que é usada e da atividade específica das enzimas.

Durante a hidrólise enzimática, os açúcares de redução são essencialmente liberados na forma de glicose.

10 As enzimas envolvidas na degradação da celulose, que são comumente denominadas de celulasas, são de diversos tipos e de diversas origens e elas são caracterizadas de modo específico através da sua atividade.

15 O custo das celulasas é relativamente alto e constitui um fator quase sempre calculado como sendo o mais dispendioso para a produção de bioetanol a partir do LVRM.

Como resultado, tem sido feitos importantes esforços para a determinação de mecanismos de hidrólise enzimática com vista a melhorar a mesma, esse sendo um processo completo de ação de proteínas solúveis em um substrato insolúvel de "refratário".

20 Outro parâmetro da eficiência e do custo – eficácia de um processo de hidrólise enzimática é o tempo da hidrólise, que pode ser relativamente longo, a partir de 48 a 72 horas.

25 Uma vez que a celulose tenha sido hidrolisada para a glicose através da hidrólise enzimática, a glicose é fermentada da mesma maneira como, por exemplo, a glicose que resulta a partir de amido.

30 Os problemas específicos conhecidos para o uso do LVRM como o substrato inicial continuam, tal como a possível presença de compostos tóxicos e inibidores que resultam das hemiceluloses e da lignina e também da possibilidade da execução da hidrólise enzimática e da fermentação em uma única etapa.

Os inibidores presentes no material hidrolisado se originam a partir da degradação dos açúcares (para furfural), de grupos presentes na

hemicelulose da lignina.

A presença de inibidores depende da natureza do LVRM e das condições com relação ao pré-tratamento do mesmo.

5 Além da inibição das enzimas através do furfural, os efeitos combinados dos diversos inibidores tem sido observados.

No que se refere à fermentação simultânea e a hidrólise de acordo com os processos de "SSF" ("Sacarificação Simultânea e Fermentação") que consistem na execução da hidrólise enzimática e da fermentação etanólica em uma única etapa, as vantagens principais da mesma são a diminuição dos investimentos através da eliminação das operações necessá-
10 rias para a hidrólise enzimática executada antes, e da ausência à inibição da celulase pela glicose, que é consumida através da de microorganismos de fermentação como parece.

15 Isso resulta no aumento dos níveis e das velocidades da hidrólise e das produtividades totais de etanol ou do bioetanol.

Alem disso, os riscos de contaminação microbiana do material hidrolisado rico em glicose são reduzidos.

No entanto, se tornou aparente que os ganhos providos através do processo SSF, d modo específico a partir do ponto de vista econômico exigem que determinados aspectos sejam otimizados, especificamente a
20 concentração inicial de material seco com a finalidade de serem obtidas altas concentrações de etanol.

Com o propósito de remediar esses inconvenientes, a invenção se objetiva a propor um processo aperfeiçoado para a produção de bioetanol
25 ou de etanol, que compreende um pré-tratamento do material em bruto de lignocelulose vegetal com a finalidade de separar a celulose, e uma hidrólise enzimática da celulose, que é caracterizado em primeiro lugar por somente uma eliminação parcial da lignina, antes da etapa de hidrólise enzimática, de modo a ser obtido um determinado nível T total residual não de zero (ex-
30 presso como uma % em peso) de lignina que é entre dois valores limite, isto é, um nível incluído dentro de uma faixa determinada. Para a análise do nível T das ligninas, as ligninas redepositadas são levadas em conta, somente

as ligninas intrínsecas.

Por certo, de forma surpreendente, foi descoberto que não é a eliminação total da lignina que torna possível alcançar o melhor rendimento possível, isto é, um nível T d hidrolise enzimática igual a 100%.

5 Mais especificamente, o processo é caracterizado em que ele compreende antes da etapa da hidrolise enzimática, uma etapa de eliminação parcial das ligninas de modo a ser obtido um nível total residual de ligninas (T), expresso como uma percentagem em peso, que não é zero e que está incluído em uma faixa determinada por um limite mais baixo (Llow) e
10 um limite mais alto (Lupp), respectivamente igual a 0,30% e 4%.

De preferência, o nível total residual de ligninas (T) está incluído em uma faixa determinada por um limite mais baixo (Llow) e um limite mais alto (Lupp), respectivamente igual a 0,35% e 3,5%.

De mais preferência, o nível total residual de ligninas (T) é igual
15 a aproximadamente 1,65%.

Esse tratamento da celulose para de forma a eliminar as ligninas com a finalidade de alcançar um nível de lignina como recomendado acima é, por exemplo, executado por meio de uma etapa de tratamento com hidróxido de sódio, seguida pela etapa de lavagem destinada a eliminar o hidróxido de sódio residual antes da etapa da hidrolise enzimática.
20

De acordo com outra característica do processo de acordo com a invenção, com o propósito de serem obtidas condições para a acidificação antes da hidrólise enzimática, e, de modo específico um pH de cerca de 5, uma "re-acidificação" da mistura é executada por meio de um ácido com um
25 pKa determinado e, especificamente por meio de ácidos orgânicos fracos tais como o ácido acético e/ou o ácido fórmico, e/ou outro ácido fraco tal como o ácido cítrico.

De acordo com uma característica do processo, a etapa para a reacidificação da mistura é executada por meio de ácido acético e/ou ácido fórmico e/ou ácido cítrico.
30

De acordo com uma característica do processo, a etapa para a reacidificação da mistura é executada por meio de uma mistura de ácido a-

cético e de ácido fórmico que contenha 0,2% de ácido fórmico em peso e 0,4% de ácido acético em peso com relação ao material de celulose seco.

Depois da referida etapa de reacidificação, o pH da mistura fica de preferência entre 4 e 6, de preferência entre 4,5 e 5,5.

5 De mais preferência depois de referida etapa de re-acidificação, o pH da mistura é igual a 5.

De acordo com uma característica do processo, a etapa para a eliminação parcial das ligninas é executada em uma temperatura de entre 80/C e 85°C.

10 De acordo com uma característica do processo, a etapa para a eliminação parcial das ligninas é executada na pressão atmosférica.

De forma surpreendente, foi demonstrado que o uso de tais ácidos torna possível ser obtido um nível máximo de hidrólise, contrário, por exemplo, ao uso de um ácido forte tal como o ácido sulfúrico.

15 Além do mais, no contexto dos processos CIMV mencionados acima, esse uso industrial do ácido acético e/ou do ácido fórmico é especificamente vantajoso uma vez que esses ácidos já são usados e estão presentes no ciclo industrial para a produção de celulose a partir do LVRM.

Entre outras vantagens da invenção, foi demonstrado que a eficiência total do processo para a produção de etanol ou de bioetanol é próximo, ou virtualmente igual à produção do nível máximo teórico de etanol a partir de LVRM e que, além disso, a eficiência é a mesma dependendo se o processo total primeiro faz uso de uma etapa de hidrólise enzimática de acordo com a invenção, e em seguida de uma etapa de fermentação, ou também se uma hidrólise simultânea e um processo de fermentação são executados (processo SSF).

20

25

Essa eficiência idêntica é devido ao fato de que a hidrólise enzimática de acordo com a invenção não produz inibidores de fermentação.

Além do mais, foi demonstrado que as vantagens do processo de acordo com a invenção (nível total de ligninas e condições específicas de re-acidificação) não foram modificadas, isto é são da mesma natureza e tem os mesmos valores, sem que seja levada em conta as celulasas usadas, e

30

especificamente se elas são celulases de uma eficiência maior ou menor.

Resultados de testes a título de exemplo:

Exemplo de enzimas testadas e a atividade das mesmas:

	Atividades em U/ml de solução enzimática			
	Xilanase	Beta-glicosidase	Celulase	
			Endo	Exo
Cellic CTec	42	3827	11+/-5	281+/-40
Accellerase 1500	7	392	12+/-6	66+/-9
AB (EL 2009060L)	8	32	1+/-05	13+/-2
AB (EL 2009096L)	0	77	2+/-1	25+/-3

Enzimas usadas para os testes: Cellic CTec e Cellic CTec 2 (enzimas de "nova geração" com uma atividade 40% maior do que as de 1ª geração).

Condições da hidrólise: Temperatura igual a 50°C, pH entre 4,5 e 5, concentração de enzimas igual a 42 U/g.

Efeito de uma extração alcalina sobre o nível da hidrólise da celulose: ver a Figura 1, na qual:

- Polpa em bruto: polpa denominada de "CIMV" depois da extração, deslignificação e lavagem;

- Polpa depois da extração alcalina: polpa em bruto tratada em pH 12 a 85°C durante uma hora.

Efeito do nível de lignina residual sobre a hidrólise de uma polpa de celulose: ver a Figura 2.

Efeito do pKa do ácido usado para a acidificação ("reacidificação") em pH 5 sobre a hidrólise da polpa de celulose:

	Ácido acético	Ácido acético + ácido fórmico	Ácido fórmico	Ácido sulfúrico
% de hidrólise depois de 24 horas	95	80	78	45

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de bioetanol partir de um material em bruto de lignocelulose vegetal que compreende as etapas sucessivas de:

5 - (a) pré-tratamento do material em bruto de lignocelulose vegetal com a finalidade de separar a celulose, as hemiceluloses e a ligninas contidas no material em bruto de lignocelulose vegetal, o pré-tratamento compreendendo as etapas sucessivas que consistem de:

10 . (i) desestruturar o material em bruto de lignocelulose vegetal através da colocação do mesmo na presença de uma mistura que contém ácido fórmico e água, em uma temperatura de reação entre 95°C e 110°C;

. (ii) em seguida, em pressão atmosférica e antes de qualquer hidrólise em seguida a ação de fermentação, na separação:

15 * por um lado, da fase sólida que consiste principalmente da referida celulose capaz de em seguida ser hidrolisada e fermentada para a produção do bioetanol;

* e por outro lado, a fase líquida que contém especificamente em uma solução de água, o ácido fórmico, as ligninas e as hemiceluloses;

20 - (b) a hidrólise enzimática da referida fase sólida;
- (c) fermentação alcoólica dos produtos que resultam a partir da referida etapa de hidrólise, que sejam capazes de serem fermentados para a produção do bioetanol,

25 caracterizado pelo fato de que o processo para produção de bioetanol compreende, antes da etapa da hidrólise enzimática as etapa (b), uma etapa de eliminação parcial das ligninas residuais da fase sólida de forma a ser obtido um nível residual total de ligninas (T), expresso como uma percentagem em peso que não é zero e que está incluída em uma faixa determinada por um limite mais baixo (Llow), e um limite mais alto (Lupp), respectivamente igual a 0,30% e 4% p/p, em que a referida etapa para a eliminação parcial das ligninas residuais é executada por meio de um tratamento
30 com hidróxido de sódio, seguido por uma etapa de lavagem destinada a eliminar o hidróxido de sódio residual e re-acidificação da mistura antes da etapa da hidrólise enzimática.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o nível residual total de ligninas (T), está incluído em uma faixa determinada por um limite mais baixo (Llow), e um limite mais alto (Lupp), respectivamente igual a 0,35% e 3,5% p/p.

5 3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o nível residual total de ligninas (T) é igual a 1,65% p/p.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o processo compreende uma etapa para a re-acidificação da mistura, que é executada por meio de um ácido, ou de uma mistura de ácidos, de pKa determinado, e de modo específico por meio de ácidos orgânicos fracos tais como o ácido acético e/ou o ácido fórmico e/ou o ácido cítrico.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de re-acidificação da mistura é executada por meio de ácido acético e/ou o ácido fórmico e/ou o ácido cítrico.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida etapa para a re-acidificação da mistura é executada por meio de uma mistura de ácido acético e ácido fórmico que contém 0,2% de ácido fórmico em peso e 0,4% de ácido acético em peso.

20 7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 6, caracterizado pelo fato de que, depois da referida etapa de re-acidificação, o pH da mistura fica entre 4 e 6.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que, depois da referida etapa de re-acidificação, o pH da mistura é de entre 4,5 e 5,5.

9. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que, depois da referida etapa de re-acidificação, o pH da mistura é igual a 5.

30 10. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida etapa para a eliminação parcial das ligninas residuais é executada em uma temperatura entre 80°C e 85° C.

11. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pe-

lo fato de que a referida etapa para a eliminação parcial das ligninas residuais é executada em pressão atmosférica.

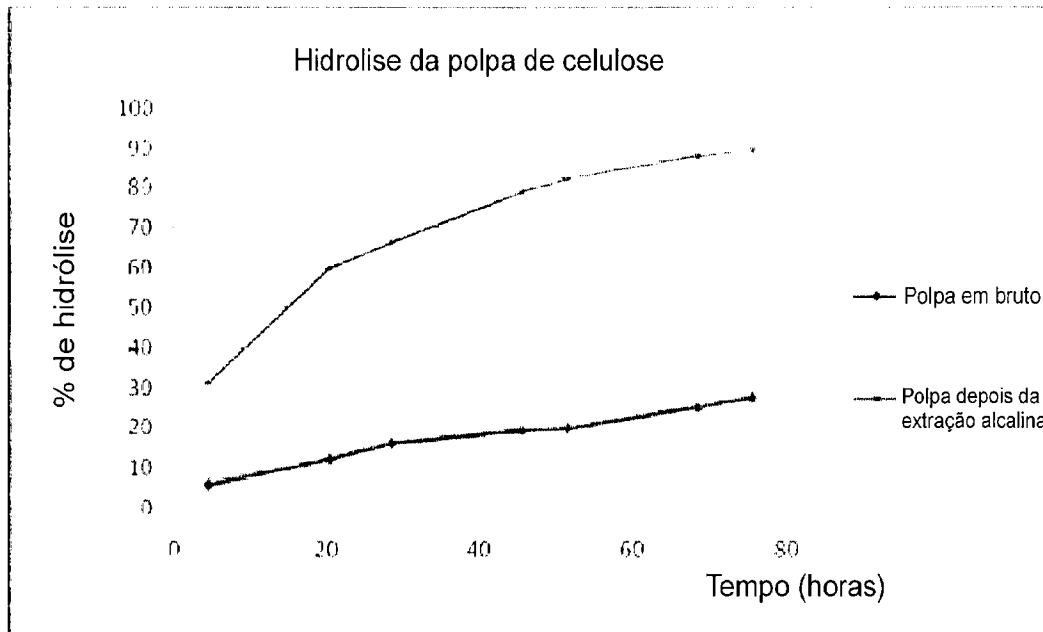


FIG. 1

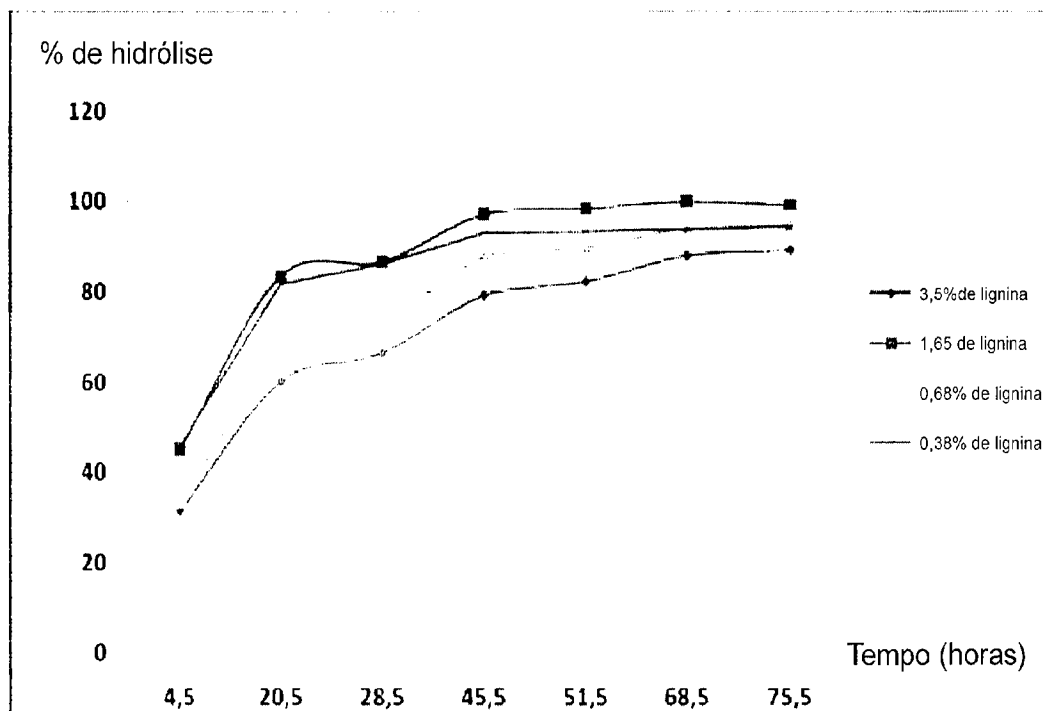


FIG. 2

RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE"**.

A presente invenção refere-se a um processo para a produção de bioetanol que compreende as etapas de pré-tratamento (consistindo da desestruturação do material em bruto de lignocelulose vegetal através da colocação do mesmo na presença de uma mistura que contém ácido fórmico, ácido acético e água, em seguida separando a celulose) de hidrólise enzimática e de fermentação alcoólica, caracterizado pelo fato de que ele compreende antes da hidrólise enzimática uma etapa de eliminação parcial das ligninas de modo a ser obtido um nível total residual de ligninas (T) expresso como uma percentagem em peso, que não é zero e que está incluído em uma faixa determinada por um limite mais baixo e um limite mais alto B_{sup} , respectivamente igual a 0,30% e 4%. Com a finalidade de serem obtidas condições de acidificação antes da etapa de hidrólise enzimática, o processo compreende uma etapa para a re-acidificação da mistura, que é executada por meio de um ácido ou de uma mistura de ácidos, de pKa determinado, e especificamente por meio de ácidos orgânicos fracos tais como o ácido acético e/ou o ácido fórmico.