



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 112016005352-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 112016005352-4

(22) Data do Depósito: 12/12/2015

(43) Data da Publicação do Pedido: 09/09/2016

(51) Classificação Internacional: C12P 7/06; C08B 37/00

(30) Prioridade Unionista: US 62/127,637 de 03/03/2015; US 14/966,650 de 11/12/2015; US 14/940,390 de 13/11/2015; US 62/139,881 de 30/03/2015

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUZIR PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO A PARTIR DE TECIDO DE PARÊNQUIMA DE PLANTA RICO EM CARBOIDRATO

(73) Titular: EDWARD BRIAN HAMRICK. Endereço: 16850 Collins Ave, Ste 112-711, Sunny Isles Beach, 33160, Florida, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: EDWARD BRIAN HAMRICK

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 12/12/2015, observadas as condições legais

Expedida em: 06/02/2018

Assinado digitalmente por:
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente



PROCESSO PARA PRODUZIR PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO A
PARTIR DE TECIDO DE PARÊNQUIMA DE PLANTA RICO EM CARBOIDRATO
DADOS SOBRE PRIORIDADE

[001] Este pedido de patente internacional reivindica prioridade do Pedido de Patente US nº 14/966.650, depositado em 11 de dezembro de 2015; Pedido de Patente US nº 14/940.390, depositado em 13 de novembro de 2015; Pedido de Patente Provisório US nº 62/139.881, depositado em 30 de março de 2015; e Pedido de Patente Provisório US nº 62/127.637, depositado em 3 de março de 2015, cada um dos quais está incorporado ao presente documento a título de referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção se refere, em geral, a métodos para fermentar culturas agrícolas ricas em carboidrato.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] Muitos organismos de fermentação convertem carboidratos em etanol. Os organismos de fermentação mais amplamente usados, a levedura de fermentador e a levedura de padeiro, são cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. O etanol tem valor econômico significativo como bebidas, combustíveis de transporte e precursores para outros compostos orgânicos.

[004] Os organismos de fermentação podem converter diretamente glicose, frutose, maltose (dímero de glicose) e sacarose (dímero de glicose-frutose) em etanol. No presente documento, os monômeros e dímeros de glicose e frutose serão referidos como açúcares simples, e organismos

de fermentação que convertem açúcares simples em etanol serão referidos como leveduras.

[005] As leveduras fermentam os açúcares simples em etanol em um ambiente anaeróbico (sem oxigênio). Um mol de glicose ou frutose (ou 0,5 mol de sacarose) é fermentado em 2 mols de etanol e 2 mols de dióxido de carbono e emite 118 kJ de calor. Isso significa que a fermentação de uma solução de açúcar de 18% irá resultar em um aumento de temperatura de 34 °C, o que significa que o resfriamento do meio de fermentação é exigido. A fermentação de 1 litro de uma solução de açúcar de 18% (1 mol de glicose) também irá produzir 2 mols de dióxido de carbono, que tem um volume de cerca de 48 litros a 20 °C e pressão atmosférica. Uma típica levedura fermenta de modo mais eficaz entre 20 e 40 °C, mas tem atividade de fermentação significativa abaixo de 5 °C (o vinho branco é fermentado entre 7 e 15 °C). As células de levedura morrem gradualmente em temperaturas acima de 42 °C. A *Saccharomyces cerevisiae* é relativamente insensível ao pH, e irá fermentar em uma faixa de pH de 2,9 a 7,2. Isso é descrito em mais detalhes por Arroyo-López no documento "Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid", *International journal of food microbiology* 131.2 (2009): 120 a 127, o qual é incorporado ao presente documento a título de referência.

[006] A maioria das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tem um diâmetro de aproximadamente 10 microns. Uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* com um tamanho de célula de aproximadamente 5 microns é *Thermosacc® Dry*, disponível junto à *Lallemand Biofuels & Distilled Spirits*, Duluth, Georgia,

EUA. A mesma produz concentrações de etanol até 20% em volume (16% em peso), então, as culturas agrícolas ricas em carboidrato com até 32% de carboidratos em peso podem ser fermentadas por essa levedura. Isso significa que uma cultura agrícola pode ser desidratada antes da fermentação de modo que a concentração de etanol resultante seja maior.

[007] As células de levedura aderem às superfícies (como células de parênquima) na presença de açúcares simples. Isso é descrito por Verstrepen e Klis no documento "Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts", *Molecular microbiology* 60.1 (2006): 5 a 15, o qual é incorporado ao presente documento a título de referência.

[008] A *Saccharomyces cerevisiae* é vendida na forma seca por congelamento e é fácil de manipular. É classificada como GRAS (Reconhecida Em Geral como Segura) e é comumente consumida na dieta regular, por exemplo, o pão é feito com levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

[009] O amido é um polímero de glicose e a inulina é um polímero, na maior parte, de frutose com glicose em uma extremidade. Antes de o amido e a inulina poderem ser convertidos por levedura em etanol, os mesmos devem, primeiro, ser convertidos em açúcares simples através de amilases e inulinases, respectivamente, ou por ácidos. O amido é insolúvel em água na faixa de temperatura para a qual a levedura é ativa, e apenas cerca de 5% de inulina é solúvel nessa faixa de temperatura.

[010] Há amilases disponíveis que convertem amido em glicose de modo eficaz na faixa de temperatura em que a levedura opera de modo eficaz. Um exemplo é a formulação de enzima STARGEN® 002 da DuPont Industrial

Biosciences, EUA. Essa contém uma alfa-amilase *Aspergillus kawachi* expressa em *Trichoderma reesei* e uma glicoamilase da *Trichoderma reesei* que funciona de modo sinérgico para hidrolisar o substrato de amido granular em glicose. A endoatividade, alfa-amilase e exoatividade, glicoamilase catalisam a hidrólise completa de amido granular sob uma variedade de condições de fermentação de etanol.

[011] Há inulissases disponíveis que convertem inulina em frutose de modo eficaz na faixa de temperatura em que a levedura opera de modo eficaz. Um exemplo é a formulação de enzima Fructozyme L disponível junto à Novozymes A/S, Dinamarca.

[012] Muitas culturas agrícolas contêm carboidratos dentro de células de parênquima de armazenamento. Essas células de parênquima ricas em carboidrato têm, em geral, de 10% a 20% de carboidratos em um único vacúolo grande com 80% a 90% de água. Esses carboidratos compreendem, em geral, açúcares simples e polissacarídeos. No presente documento, as partes dessas culturas agrícolas ricas em carboidrato que contêm uma massa significativa de células de parênquima ricas em carboidrato serão referidas como tecido de parênquima rico em carboidrato. Todas as culturas agrícolas com tecido de parênquima rico em carboidrato contêm alguma quantidade de açúcares simples nas células de parênquima, e algumas contêm uma quantidade significativa de polissacarídeos.

[013] Há dois tipos de culturas agrícolas com tecido de parênquima rico em carboidrato, monocotiledôneas (monocots) na família gramínea (Poaceae e Dioscorea) e dicotiledôneas (dicots). Os mesmos se diferem no modo com que

as células de parênquima se aderem entre si. As monocots se aderem através tanto da pectina quanto da hemicelulose na lamela intermediária, e as dicots se aderem através de pectina na lamela intermediária.

[014] As culturas agrícolas cultivadas de modo mais amplo com tecido de parênquima rico em carboidrato nos caules são cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), sorgo doce (*Sorghum bicolor*) e híbrido de milho tropical (*Zea mays*). Essas são todas monocots na família gramínea (*Poaceae*). A cana-de-açúcar e o híbrido de milho tropical contêm açúcares simples nas células de parênquima de armazenamento, e o sorgo doce contém 90% de açúcares simples e 10% de amido nas células de parênquima de armazenamento.

[015] As culturas agrícolas cultivadas de modo mais amplo com tecido de parênquima rico em carboidrato em tubérculos são batata (*Solanum tuberosus*), batata doce (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), inhame (genus *Dioscorea*) e alcachofra-girassol (*Helianthus tuberosus*). A batata, batata doce, mandioca e alcachofra-girassol são dicots, enquanto o inhame é uma monocot. A batata, batata doce, mandioca e inhame contêm amido nas células de parênquima de armazenamento, e a alcachofra-girassol contém inulina nas células de parênquima de armazenamento.

[016] As culturas agrícolas cultivadas de modo mais amplo com tecido de parênquima rico em carboidrato em frutas são maçãs, uvas e laranjas. Essas são todas dicots, e contêm glicose e frutose nas células de parênquima de armazenamento.

[017] Há técnicas bem conhecidas para fermentar culturas agrícolas com tecido de parênquima rico em carboidrato. Os caules são, em geral, triturados entre uma série de cilindros para extrair o suco através da ruptura das células de parênquima e, então, o suco é separado dos sólidos residuais e fermentado. As beterrabas sacarinas são cortadas, em geral, em pequenos pedaços de aproximadamente 4 mm de espessura (lascas - cossettes), e o açúcar é extraído com água quente corrente e é, então, fermentado. As frutas são, em geral, espremidas para extrair suco rico em açúcar que é, então, fermentado. As culturas agrícolas de amido são, em geral, convertidas em etanol aquecendo-se o tubérculo acima da temperatura de gelatinização, e com o uso de amilases com o amido gelatinizado seguido da fermentação da glicose. As culturas agrícolas ricas em inulina são fermentadas, em geral, através de aquecimento até que a inulina solubilize, da extração do suco, com o uso de hidrólise de ácido para converter frutose e, então, fermentação da frutose. Todas essas técnicas são um tanto intensas quanto a capital.

[018] As células de parênquima de armazenamento em tecido de parênquima rico em carboidrato são células poliédricas com paredes finas. As células de parênquima de beterraba sacarina têm um diâmetro de aproximadamente 100 microns com uma espessura de parede de cerca de 2 microns. As células de parênquima em caules têm aproximadamente 360 microns de comprimento e 60 microns de diâmetro, com uma espessura de parede de cerca de 2 microns. As características do tecido de parênquima de armazenamento são descritas em mais detalhes por Gibson no documento "The hierarchical structure and mechanics of plant materials", Journal of The

Royal Society Interface 9.76 (2012): 2.749 a 2.766, que é incorporado ao presente documento a título de referência.

[019] As células de parênquima são empacotadas juntas de modo hermético, mas há pequenas lacunas entre as mesmas devido ao fato de o empacotamento ser imperfeito. Essas lacunas são conhecidas como o apoplasto ou espaço intercelular. Essas lacunas são interconectadas, e a água pode fluir através do tecido de parênquima através dessas lacunas. Há mais detalhes sobre o fluxo de água através do apoplasto no documento de Steudle, "Water transport in plants: role of the apoplast", *Plant and Soil* 187.1 (1996): 67 a 69, que é incorporado ao presente documento a título de referência.

[020] A água flui através do apoplasto no tecido de parênquima de beterraba sacarina na direção axial (para cima/para baixo), mas é limitada na direção radial (para dentro/para fora) pelas estrias de Caspary nas raízes. Isso é descrito em mais detalhes por Amodeo, no documento "Radial and axial water transport in the sugar beet storage root", *Journal of Experimental Botany* 50.333 (1999): 509 a 516, que é incorporado ao presente documento a título de referência.

[021] De modo semelhante, a água flui através do apoplasto no tecido de parênquima de caules ricos em carboidrato na direção axial, mas é limitada pelo comprimento de internódio (as seções contínuas do caule). A água não flui na direção radial devido ao fato de a parte externa do caule ser impenetrável à água. O internódio da maioria dos caules ricos em carboidrato está entre 100 mm e 300 mm de comprimento.

[022] O apoplasto (espaço intercelular) de cana-de-açúcar é suficientemente grande para ser colonizado por uma variedade de bactérias. Isso é descrito em mais detalhes por Dong no documento "A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast)", *Plant Physiology* 105.4 (1994): 1.139 a 1.147 e por Tejera no documento "Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes", *Journal of plant physiology* 163.1 (2006): 80 a 85, ambos dos quais são incorporados ao presente documento a título de referência. De modo semelhante, o apoplasto de outras espécies de tecido de parênquima rico em carboidrato é grande o bastante para ser colonizado por bactérias.

[023] É possível encher o apoplasto de tecido de parênquima rico em carboidrato com o uso de infusão a vácuo (também chamada de impregnação a vácuo). Isso envolve circundar o tecido de parênquima com um líquido, aplicar um vácuo, esperar que líquido e gás sejam expelidos do tecido, liberar o vácuo e esperar o encher o apoplasto. Isso é descrito em mais detalhes por Gras, no documento "The response of some vegetables to vacuum impregnation", *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3.3 (2002): 263 a 269, que é incorporado ao presente documento a título de referência.

[024] O tecido de parênquima rico em carboidrato contém, frequentemente, até 20% (em massa) de carboidratos. A parede celular de parênquima fornece resistência para a célula de parênquima, e a membrana celular impede que os conteúdos da célula escoem para fora da célula. A parede celular é impermeável à sacarose e a outros açúcares

simples. A membrana celular pode ser desnaturada através de calor, geralmente, acima de 70 °C, o que aumenta o coeficiente de difusão de açúcares simples através da membrana celular. Essa é a técnica normalmente usada para extrair sacarose de beterrabas sacarinas - a membrana celular é desnaturada através de calor e, então, a sacarose se espalha para fora da beterraba sacarina para a água quente. O coeficiente de difusão de sacarose através do tecido de beterraba sacarina desnaturado é cerca de cinco vezes maior do que através do tecido de beterraba sacarina não desnaturado, que é descrito em mais detalhes por Bessadok-Jemaiet al., no documento "Modeling the kinetic of solute diffusion from sugarbeet particles based on electric conductivity measurements", International Journal of Physical Sciences 6.28 (2011): 6.464 a 6.468, que é incorporado ao presente documento a título de referência.

[025] As células de parênquima podem ser maceradas (separadas umas das outras) através de calor ou enzimas. Quando as células de parênquima forem maceradas, a membrana celular não é rompida, tanto a partir de ação mecânica quanto de enzimas que são liberadas da parede celular. Isso faz com que os conteúdos dos vacúolos escoem das células de parênquima e façam com que as enzimas se espalhem com mais facilidade para os vacúolos. Isso também fornece uma ação de imersão, em que a água nas células de parênquima pode ser removida com mais facilidade através de compressão ou evaporação. Qualquer combinação de pectina liase, pectato liase e poligalacturanase macera as células de parênquima em dicots, enquanto a pectina liase e a xilanase maceram as células de parênquima em monocots. Isso é descrito

por Ishii no documento "Enzymes for the isolation of protoplasts", Plant Protoplasts and Genetic Engineering I. Springer Berlin Heidelberg, 1989, 23 a 33, que é incorporado ao presente documento a título de referência.

[026] A pectato liase e a poligalacturanase, quando as mesmas degradam a pectina, também produzem metanol, que é muitas vezes um produto indesejável quando se produz etanol. A pectina liase degrada a pectina sem produzir metanol como um subproduto, e a xilanase não produz quaisquer álcoois. Há pectinas liases disponíveis que operam no mesmo pH e na mesma faixa de temperatura que a levedura, especificamente, a pectina liase do *Aspergillus niger*, com um pH ideal de 5,5 e uma temperatura ideal de 35 °C. Isso é descrito por Yadav et al. no documento "Pectin lyase: a review" Process Biochemistry 44.1 (2009): 1 a 10, que é incorporado ao presente documento a título de referência. Um exemplo de uma pectina liase que opera no mesmo pH e na mesma faixa de temperatura da levedura é a formulação de enzima "Pectinex® Ultra Color", disponível junto à Novozymes A/S, Dinamarca.

[027] Quando na fermentação, a levedura produz grandes quantidades de dióxido de carbono (CO₂). O ácido carbônico é formado pela dissolução de CO₂ em água. Quando na fermentação, a pressão parcial de CO₂ é 100 kPa (1 atm), e o pH dessa solução é cerca de 3,92. A levedura fermenta bem nesse pH, as enzimas de pectina liase de *Aspergillus niger* (como Pectinex Ultra Color) têm atividade significativa nesse pH, as enzimas hidrolisantes de amido granular (como STARGEN) têm atividade significativa nesse pH, e as enzimas inulinase (como Fructozyme L) têm atividade significativa nesse pH. De

modo semelhante, todas essas enzimas têm atividade significativa na faixa de temperatura de levedura (25 °C a 40 °C).

[028] A temperatura de colheita da beterraba sacarina pode ser um tanto fria, muitas vezes, abaixo de 10 °C, e a temperatura de colheita da cana-de-açúcar, sorgo doce e híbridos de milho tropical pode ser abaixo de 20 °C. No entanto, o calor liberado pela fermentação de açúcares simples no apoplasto de tecido de parênquima rico em carboidrato irá aumentar rapidamente a temperatura desse tecido até a faixa de temperatura em que as enzimas têm atividade significativa.

[029] A taxa de fermentação é altamente influenciada pela concentração de células de levedura. A fermentação de cana-de-açúcar em típicos moinhos no Brasil pode ocorrer entre 6 e 10 horas, mas isso exige altas concentrações (10% p/p) de levedura e reciclagem de célula de levedura. Isso é descrito em mais detalhes por Basso no documento "Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation", INTECH Open Access Publisher, 2011, que é incorporado ao presente documento a título de referência. A fermentação do vinho ou da cerveja, com concentrações menores de levedura, pode levar até uma semana.

[030] Um problema significativo com as técnicas atuais para fermentar açúcares em etanol é a contaminação bacteriana, especificamente, a contaminação por *Lactobacillus*. Sem o desejo de se vincular a qualquer teoria específica, acredita-se que a mistura turbulenta propague as bactérias por todo o meio de fermentação e, uma vez que as

bactérias contaminantes podem superar a levedura, há contaminação significativa. Sem mistura e sem um gradiente na concentração de açúcar (causada pela distribuição uniforme de levedura no tecido de parênquima rico em carboidrato), qualquer contaminação bacteriana possível permanece localizada e não tem a capacidade de superar a levedura através de todo o volume de biomassa. Isso é descrito por Kundiyana et al. no documento "Influence of temperature, pH and yeast on in-field production of ethanol from unsterilized sweet sorghum juice", biomass and bioenergy 34.10 (2010): 1.481 a 1.486, que é incorporado ao presente documento a título de referência.

[031] Devido ao fato de as células de parênquima serem tão pequenas, precisa-se de muita energia para triturar as mesmas ou para extrair o açúcar das mesmas com água quente. Quase 35% dos custos operacionais e de capital da produção de açúcar dos caules é devido ao custo de trituração. De modo semelhante, muito do custo de produção de açúcar das beterrabas sacarinas é devido ao custo da extração com água quente. A economia da trituração de cana-de-açúcar é descrita em mais detalhes por Gbabo no documento "Comparative study on cane cutter/juice expeller and roller model Sugarcane juice extraction systems", INT J CURR SCI 2013, 7: E 55 a 60, que é incorporado ao presente documento a título de referência. Isso reduziria os custos de extração de açúcares se a necessidade por trituração ou extração com água quente pudesse ser eliminada.

[032] A densidade aparente de beterrabas sacarinas é cerca de 769 kg/m³, e a densidade aparente de pedaços (seções recortadas) de cana-de-açúcar, sorgo doce e

híbridos de milho tropical (isto é, caules) é cerca de 350 kg/m³. Se o teor de açúcar for cerca de 18%, isso resulta em uma densidade de açúcar de 138 kg de açúcar por metro cúbico de beterrabas sacarinas e 63 kg de açúcar por metro cúbico de cana-de-açúcar, sorgo doce e híbridos de milho tropical. Uma vez que os custos de transporte são, principalmente, uma função do volume (e não do peso) e, uma vez que as culturas agrícolas são muitas vezes colhidas em distâncias significativas de onde foram processadas, é um tanto caro transportar açúcares com densidades baixas uma vez que apenas de 5% a 10% do volume de um caminhão é ocupado por açúcar. Deseja-se reduzir o custo de fabricar etanol a partir de culturas agrícolas ricas em carboidrato produzindo-se etanol no local de colheita (ou próximo to) dessas culturas agrícolas, reduzindo os custos de transporte.

[033] As células de parênquima no tecido de parênquima rico em carboidrato são tecido vivo e, portanto, respiram (inalam) após a colheita. A respiração envolve converter oxigênio e açúcar nas células de parênquima em dióxido de carbono e energia para manter a célula. Após as beterrabas sacarinas serem colhidas, cerca de 200 g de açúcar por dia por tonelada métrica de beterraba sacarina são consumidos através de respiração e, nos primeiros 5 dias após a colheita, cerca de 600 a 1.500 g de açúcar por dia por tonelada métrica de beterraba sacarina são consumidos através de respiração. Se as beterrabas sacarinas tiverem cerca de 18% de açúcar em peso, há cerca de 180 kg de açúcar em uma tonelada métrica de beterraba sacarina, resultando em uma perda entre 0,3% a 0,8% de açúcar por dia nos primeiros 5 dias e 0,1% de açúcar por dia nos dias seguintes. Dado que as

beterrabas sacarinas podem ser armazenadas por 100 dias antes de serem processadas, as mesmas podem perder até 10% de seu teor de açúcar devido à respiração. A cana-de-açúcar, o sorgo doce e o milho tropical perdem quantidades semelhantes de açúcar quando são armazenados. Há uma necessidade na técnica de reduzir a perda de açúcar para a respiração convertendo-se mais rapidamente carboidratos em etanol do que os métodos atuais. Uma vez que os carboidratos em culturas agrícolas são convertidos em etanol, os mesmos podem ser armazenados por períodos longos, permitindo a remoção contínua do etanol durante o ano todo. Deseja-se usar de modo eficaz o capital investido na extração com cilindro, na separação de etanol e destilação com o uso desse equipamento durante o ano todo, não apenas durante a temporada de colheita.

[034] Se as beterrabas sacarinas forem armazenadas em condições anaeróbicas (sem oxigênio), os micro-organismos irão colonizar as beterrabas e, após 21 dias, irão fermentar completamente todo o açúcar nessas beterrabas, na maioria, em ácido lático e ácido acético. Uma vez que a camada externa das beterrabas sacarinas é muitas vezes raspada e danificada pela colheita, os micro-organismos podem penetrar com mais facilidade nas camadas externas da beterraba sacarina, levando a perdas de açúcar devido à fermentação em ácido lático e ácido acético. De modo semelhante, a cana-de-açúcar, o sorgo doce e o híbrido de milho tropical são mais suscetíveis aos micro-organismos que penetram na seiva devido ao fato de que a cana foi cortada em pedaços durante a colheita.

[035] Muito do custo capital e do custo operacional de produção de etanol de culturas agrícolas ricas

em carboidrato é o custo de aquecimento da matéria prima. Esses custos poderiam ser reduzidos (ou eliminados) com o uso do autoaquecimento da liberação de energia através de fermentação.

[036] Algumas técnicas para produzir etanol a partir de culturas agrícolas ricas em carboidrato exigem pré-tratamento ou fermentação dentro de um reservatório de pressão. Devido ao fato de os reservatórios de pressão terem um risco de explosão e exigirem mais resistência do que um reservatório não pressurizado, seria benéfico não exigir um reservatório de pressão.

[037] Um outro custo capital e custo operacional significativo de produção de etanol de culturas agrícolas ricas em carboidrato é o custo de resfriamento do reator de fermentação. Seria desejável usar o resfriamento passivo de baixo custo como o sopro de ar sobre os tanques com parede de metal ou a circulação de gás dióxido de carbono frio através da cultura agrícola.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[038] A invenção fornece um processo para produzir produtos de fermentação a partir de tecido de parênquima de planta rico em carboidrato, sendo que o processo compreende as etapas de:

(a) fornecer o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato em uma temperatura de cultura agrícola;

(b) combinar o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato com uma solução de reagente aquosa em uma temperatura de reagente que contém um organismo de fermentação;

(c) expor o tecido de parênquima de planta rico em

carboidrato a uma pressão de preparação de fase gasosa por um tempo de preparação, ou antes da etapa (b) ou seguindo a etapa (b), em que a pressão de preparação de fase gasosa é menor do que a pressão atmosférica;

(d) expor o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato a uma pressão de infusão de fase gasosa por um tempo de infusão, em que a pressão de infusão de fase gasosa é maior do que a pressão de preparação de fase gasosa; e

(e) manter uma pressão de fermentação de fase gasosa por um tempo de fermentação para produzir produtos de fermentação dentro do tecido de parênquima de planta rico em carboidrato, em que a pressão de fermentação de fase gasosa é maior do que a pressão de preparação de fase gasosa e em que pelo menos 25% da massa dos produtos de fermentação é etanol.

[039] Em modalidades preferenciais, o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato é selecionado a partir do grupo que consiste em caules de cana-de-açúcar, caules de sorgo doce, caules híbridos de milho tropical, tubérculos de beterraba sacarina, maçãs, uvas e laranjas. Em algumas modalidades, o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato é selecionado a partir do grupo que consiste em tubérculos de batata, tubérculos de batata doce, tubérculos de mandioca, tubérculos de inhame e tubérculos de alcachofra-girassol.

[040] Em algumas modalidades, a solução de reagente aquosa contém enzimas pectinase. Em algumas modalidades, a solução de reagente aquosa contém enzimas xilanase. Em algumas modalidades, a solução de reagente aquosa contém enzimas amilase. Em algumas modalidades, a solução de reagente aquosa contém enzimas inulinase.

[041] Em modalidades preferenciais, a temperatura de cultura agrícola é de cerca de 5 °C a cerca de 40 °C.

[042] Em modalidades preferenciais, a pressão de preparação de fase gasosa é de cerca de 105% a cerca de 200% da pressão de equilíbrio de água na temperatura mais alta dentre a temperatura de cultura agrícola e a temperatura de reagente.

[043] Em modalidades preferenciais, o tempo de preparação é de cerca de 1 minuto a cerca de 1 hora.

[044] Em modalidades preferenciais, o organismo de fermentação é *Saccharomyces cerevisiae*.

[045] Em modalidades preferenciais, a temperatura de reagente é de cerca de 20 °C a cerca de 40 °C.

[046] Em modalidades preferenciais, a solução de reagente aquosa é homogeneizada. Em algumas modalidades, o processo compreende adicionalmente misturar a solução de reagente aquosa com o uso de energia turbulenta na faixa de cerca de 0,15 W/kg a cerca de 50 W/kg.

[047] Em modalidades preferenciais, o tempo de infusão é de cerca de 1 minuto a cerca de 1 hora.

[048] Em modalidades preferenciais, o tempo de fermentação é de cerca de 6 horas a cerca de 7 dias.

[049] Em modalidades preferenciais, a pressão de fermentação é a pressão atmosférica.

[050] Em algumas modalidades, o processo compreende adicionalmente manter o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato em um ambiente anaeróbico por um

tempo de preservação de cultura agrícola subsequente à conclusão do tempo de fermentação.

[051] Em modalidades preferenciais, o processo compreende adicionalmente recuperar os produtos de fermentação através de separação a vácuo. Em algumas modalidades, o processo compreende adicionalmente recuperar os produtos de fermentação através de trituração. Em algumas modalidades, o processo compreende adicionalmente drenar a solução de reagente aquosa, antes da etapa (e) ou em seguida à etapa (e).

BREVES DESCRIÇÕES DOS DESENHOS

[052] A Figura 1 é um desenho esquemático de um aparelho experimental usado em modalidades e exemplos da presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES DA INVENÇÃO

[053] Os métodos, processos e sistemas da presente invenção serão descritos em detalhes por meio de referência às várias modalidades não limitantes e à(s) Figura(s).

[054] Essa descrição possibilitará que um versado na técnica produza e use a invenção, e a mesma descreve diversas modalidades, adaptações, variações, alternativas e usos da invenção. Essas e outras modalidades, recursos e vantagens da presente invenção se tornarão evidentes àqueles versados na técnica quando tomados em referência à descrição detalhada da invenção em conjunto com os desenhos anexos.

[055] Conforme usado no relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares de "um", "uma", "o" e "a" incluem referentes plurais, a menos que o

contexto indique claramente o contrário. Exceto onde definido ao contrário, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado como comumente entendido por um indivíduo de habilidade comum na técnica a que esta invenção pertence.

[056] Exceto onde indicado ao contrário, todos os números que expressam parâmetros, condições, resultados e, dessa forma, usados no relatório descritivo e nas reivindicações devem ser entendidos como sendo modificados em todas as instâncias pelo termo "cerca de". Dessa maneira, exceto onde indicado ao contrário, os números estabelecidos no relatório descritivo e nas reivindicações apresentados a seguir são aproximações que podem variar dependendo dos algoritmos e cálculos específicos.

[057] O termo "que compreende", que é sinônimo de "que inclui", "que contém" ou "caracterizado por" é inclusivo e abrangente, e não exclui elementos ou etapas de método adicionais e não recitados. "Que compreende" é um termo da técnica usado na linguagem das reivindicações que significa que os elementos das reivindicações nomeado são essenciais, mas outros elementos das reivindicações podem ser adicionais e ainda formar uma construção dentro do escopo das reivindicações.

[058] Conforme usado no presente documento, a expressão "que consiste em" exclui qualquer elemento, etapa ou ingrediente não especificado nas reivindicações. Quando a expressão "consiste em" (ou variações da mesma) aparecer em uma cláusula do corpo de uma reivindicação, em vez de seguir imediatamente o preâmbulo, a mesma limita apenas o elemento estabelecido nessa cláusula; outros elementos não são

excluídos da reivindicação como um todo. Conforme usado no presente documento, a expressão "que consiste essencialmente em" limita o escopo de uma reivindicação aos elementos ou etapas de método específicos e àqueles que não afetam materialmente a(s) característica(s) básica(s) e inovadora(s) da matéria reivindicada.

[059] Em relação aos termos "que compreende", "que consiste em" e "que consiste essencialmente em", onde um desses três termos é usado no presente documento, a matéria presentemente revelada e reivindicada pode incluir o uso de qualquer um dos outros dois termos. Assim, em algumas modalidades não explicitamente mencionadas de outro modo, qualquer ocorrência de "que compreende" pode ser substituída por "que consiste em" ou, alternativamente, por "que consiste essencialmente em".

[060] Nenhuma modalidade descrita no presente documento deve ser limitada a qualquer teoria ou especulação em relação aos mecanismos de reação, mecanismos de transferência de massa ou descrições de matérias primas ou produtos.

[061] A presente invenção é presumida em uma solução técnica para o problema de que a produção de produtos de fermentação a partir de tecido de parênquima de planta rico em carboidrato é cara devido à grande quantidade de energia e capital exigida para a trituração ou extração de modo eficaz com difusão em água quente. Essa invenção usa uma abordagem alternativa de infundir reagentes de fermentação sob vácuo no apoplasto do tecido de parênquima de planta rico em carboidrato, permitindo que fermente e, então, separando a solução de etanol resultante com o uso de técnicas de baixo

custo como a separação a vácuo. Os princípios da invenção são demonstrados nos Exemplos da presente invenção.

[062] A presente invenção também é presumida em uma solução técnica para o problema de degradação de culturas agrícolas ricas em inulina e ricas em amido após a colheita e antes do processamento e do consumo. Esta invenção usa uma abordagem de infundir organismos de fermentação sob vácuo no apoplasto de tecido de parênquima para fermentar os açúcares simples em etanol, retirando, assim, outros organismos dos açúcares simples necessários para colonizar e consumir o amido ou a inulina. Isso resulta em uma típica perda de 0,1% da massa do tecido rico em carboidrato e no benefício de proteger o amido ou a inulina contra a degradação. Uma vez que os açúcares simples são fermentados, os únicos organismos que podem degradar esses tecidos de parênquima são fungos que se desenvolvem na pectina, organismos que se desenvolvem no etanol e organismos que se desenvolvem no amido ou inulina.

[063] A maioria dos fungos que se desenvolvem na pectina são anaeróbicos, então, manter o ambiente anaeróbico impede que esses fungos colonizem o tecido de parênquima. Os fungos anaeróbicos que se desenvolvem na pectina, especialmente *Rhizopus oryzae*, também exigem que a glicose se desenvolva na pectina, então, manter o ambiente livre de glicose, assim como anaeróbico, impede que esses fungos colonizem o tecido de parênquima.

[064] Os organismos que se desenvolvem no etanol, especialmente *Acetobacter*, também são aeróbicos, então, manter o ambiente anaeróbico impede que esses organismos convertam etanol em ácido acético.

[065] Os organismos que se desenvolvem em amido, especialmente *Bacillus subtilis*, precisam ter acesso aos grânulos de amido dentro do tecido de parênquima. Sem o desejo de se vincular a qualquer teoria específica, acredita-se que a remoção de glicose no apoplasto e dentro das células de parênquima faça com que os organismos como *Bacillus subtilis* não tenham energia suficiente para serem capazes de se mover dentro do tecido de parênquima.

[066] A levedura produz grandes quantidades de dióxido de carbono enquanto na fermentação, e a infusão de levedura no tecido de parênquima de planta rico em carboidrato forma uma espuma no lado de fora desse tecido durante a fermentação e expelle o líquido desse tecido através da ação da formação de bolhas dentro do tecido. Surpreendentemente, a levedura não é expulsa por essas bolhas, e a levedura pode continuar a fermentação até que todos os açúcares simples sejam fermentados.

[067] Sem o desejo de se vincular a qualquer teoria específica, acredita-se que a adesão das células de levedura às células de parênquima na presença de glicose seja mais forte do que as forças das bolhas de dióxido de carbono que agem para expelir a levedura do tecido de parênquima.

[068] Essa invenção também é presumida no fato de que a taxa de difusão de açúcares simples através da membrana celular em células de parênquima de culturas agrícolas ricas em carboidrato é suficiente para possibilitar que os organismos de fermentação no apoplasto fermentem os açúcares simples dentro das células de parênquima em uma taxa elevada. O etanol, então, se espalha nas células de parênquima. Em algumas variações, as paredes celulares do

parênquima não são degradadas, mantendo a resistência estrutural da cultura agrícola, o que possibilita o uso da separação a vácuo de baixo custo. Em outras variações, as pectinases degradam as paredes celulares do parênquima, aumentando a velocidade de fermentação e reduzindo a energia para desidratar o tecido após a remoção do etanol.

[069] Em algumas variações, a invenção fornece um processo para produzir produtos de fermentação a partir de tecido de parênquima de planta rico em carboidrato, sendo que o processo compreende as etapas de:

(a) fornecer tecido de parênquima de planta rico em carboidrato em uma temperatura de cultura agrícola;

(b) combinar o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato com uma solução de reagente aquosa em uma temperatura de reagente que contém um organismo de fermentação;

(c) expor o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato a uma pressão de preparação de fase gasosa por um tempo de preparação, ou antes da etapa (b) ou seguindo a etapa (b), em que a pressão de preparação de fase gasosa é menor do que a pressão atmosférica;

(d) expor o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato a uma pressão de infusão de fase gasosa por um tempo de infusão, em que a pressão de infusão de fase gasosa é maior do que a pressão de preparação de fase gasosa; e

(e) manter uma pressão de fermentação de fase gasosa por um tempo de fermentação para produzir produtos de fermentação dentro do tecido de parênquima de planta rico em carboidrato, em que a pressão de fermentação de fase gasosa é maior do que a pressão de preparação de fase gasosa e em que

pelo menos 25% da massa dos produtos de fermentação é etanol.

[070] Aqueles versados na técnica irão reconhecer que a pressão de preparação de fase gasosa pode ser aplicada antes ou depois de combinar o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato com uma solução de reagente aquosa. Gras descreve a combinação antes de aplicar um vácuo, e os exemplos abaixo descrevem a combinação após aplicar um vácuo. A combinação antes de aplicar um vácuo, conforme descrito por Gras, tem a vantagem de um tempo de bombeamento descendente mais rápido, uma vez que menos volume precisa ser evacuado. No entanto, a mesma tem a desvantagem de ter uma pressão hidrostática maior no fundo de um reservatório maior. Para um reservatório com apenas 1 m de profundidade, essa desvantagem não é significativa, mas para reservatórios mais profundos, essa desvantagem pode ser significativa.

[071] Aqueles versados na técnica irão reconhecer que há uma ampla gama de organismos de fermentação que produzem etanol, e esses organismos de fermentação se aderem às superfícies na presença de glicose.

[072] A infusão a vácuo pode ser feita com um reservatório de resistência moderada cheio até o topo com tubérculos ou caules, e com uma bexiga de borracha no topo - quando um vácuo for aplicado, a resistência da própria cultura agrícola é o que suporta a pressão atmosférica de 100 kPa no lado de fora do reservatório. Isso resulta em um reservatório de infusão a vácuo com custo muito baixo, e o custo de energia de bombeamento de ar desse reservatório de infusão a vácuo também é um tanto baixa. Em algumas modalidades, esse reservatório de infusão a vácuo pode ser o

caminhão que transporta a cultura agrícola do campo, com uma bexiga de borracha inserida sobre no topo, por exemplo.

[073] Uma vez que a solução de reagente aquosa é infundida, a cultura agrícola pode ser transferida para um reservatório de fermentação com custo ainda mais baixo. Esse reservatório de fermentação com custo ainda mais baixo não precisa ser à prova de ar, apenas fechado de modo apertado o suficiente para conter o dióxido de carbono que é produzido através da fermentação para manter a fermentação anaeróbica, impedindo, assim, a degradação do etanol por bactérias *Acetobacter*.

[074] Em modalidades preferenciais, o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato é selecionado a partir do grupo que consiste em caules de cana-de-açúcar, caules de sorgo doce, caules híbridos de milho tropical, tubérculos de beterraba sacarina, maçãs, uvas e laranjas. Todos esses contêm, principalmente, açúcares simples no tecido de parênquima e podem ser fermentados com levedura, sem exigir a infusão de pectinase. Opcionalmente, a pectinase acelera a fermentação, apesar do custo de complexidade e do custo adicional das enzimas.

[075] Em algumas modalidades, o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato é selecionado a partir do grupo que consiste em tubérculos de batata, tubérculos de batata doce, tubérculos de mandioca, tubérculos de inhame e tubérculos de alcachofra-girassol. Essas culturas agrícolas contêm uma pequena quantidade de açúcares simples, entre 0,01% a 2% em peso, e o restante dos carboidratos como polissacarídeos. Para preservar essas culturas agrícolas, a infusão de levedura irá converter as pequenas quantidades de

açúcares simples em etanol. Para converter os polissacarídeos nessas culturas agrícolas em etanol, uma infusão adicional de uma pectinase e uma amilase ou inulinase é necessária.

[076] Em algumas modalidades, a solução de reagente aquosa contém enzimas pectinase. Em algumas modalidades, a solução de reagente aquosa contém enzimas xilanase. Em algumas modalidades, a solução de reagente aquosa contém enzimas amilase. Em algumas modalidades, a solução de reagente aquosa contém enzimas inulinase. A enzima pectinase preferencial é a pectina liase em modalidades que exigem a produção mínima de metanol como um subproduto. Uma combinação de pectinase e xilanase é necessária para quebrar as paredes celulares do parênquima em dicots.

[077] Em modalidades preferenciais, a temperatura de cultura agrícola é de cerca de 5 °C a cerca de 40 °C. Essa faixa de temperatura é necessária devido ao fato de os organismos de fermentação serem ativos nessa faixa.

[078] Em modalidades preferenciais, a pressão de preparação de fase gasosa é de cerca de 105% a cerca de 200% da pressão de equilíbrio de água na temperatura mais alta dentre a temperatura de cultura agrícola e a temperatura de reagente. A pressão precisa estar tão baixa quanto possível enquanto ainda impede que a cultura agrícola ou o reagente ferva.

[079] Em modalidades preferenciais, o tempo de preparação é de cerca de 1 minuto a cerca de 1 hora. Algumas culturas agrícolas demoram mais do que outras para evacuar o gás do apoplasto, especificamente cana-de-açúcar e sorgo doce.

[080] Em modalidades preferenciais, o organismo de fermentação é *Saccharomyces cerevisiae*. Esse organismo tem a mais alta tolerância de etanol de qualquer organismo de fermentação e muitos híbridos estão disponíveis.

[081] Em modalidades preferenciais, a temperatura de reagente é de cerca de 20 °C a cerca de 40 °C. Os organismos de fermentação prosperam nessa faixa de temperatura.

[082] A temperatura de reagente deve ser baixa o bastante de modo que a água na solução de reagente aquosa não ferve na pressão de preparação, em que a ebulição confere a liberação rápida de vapor como bolhas grandes. Uma vez que a água é normalmente a constituinte principal da solução de reagente aquosa, os dados de equilíbrio de água podem ser usados para determinar a temperatura de reagente em uma dada pressão de preparação e vice-versa. Por exemplo, se a temperatura de reagente for cerca de 38 °C, a pressão de preparação deve ser maior do que cerca de 7 kPa.

[083] Em modalidades preferenciais, a solução de reagente aquosa é homogeneizada. Em algumas modalidades, o processo compreende adicionalmente misturar a solução de reagente aquosa com o uso de energia turbulenta na faixa de cerca de 0,15 W/kg a cerca de 50 W/kg.

[084] A energia turbulenta suficiente é usada de modo que a escala de comprimento de Kolmogorov está na ordem de menos do que o comprimento livre de apoplasto (por exemplo, cerca de 10 microns). Com o uso da escala de comprimento de Kolmogorov, conhecendo-se a viscosidade cinemática de água a 20 °C é cerca de 10^{-6} m²/seg, a energia exigida para misturar os reagentes e processar a água para

uma escala de 10 microns é cerca de 50 W/kg. De modo semelhante, a mistura para uma escala de 20 microns exige cerca de 5 W/kg e a mistura para uma escala de 50 microns exige cerca de 0,15 W/kg.

[085] Uma pessoa de habilidade comum na técnica irá reconhecer que há muitos dispositivos de mistura simples que podem se misturar com esse tipo de energia. Um tal dispositivo de mistura simples é um cano plástico com 25 mm de diâmetro, 8 metros de comprimento com uma aspereza de cano de 0,0014, que infunde a partir da pressão atmosférica (100 kPa) até um vácuo de 20 kPa com uma bomba de vácuo de 2,8 litros/seg (6 CFM) que mantém o vácuo durante a infusão. A potência dissipada no cano devido à queda de pressão é 226,4 W. A quantidade total de líquido no cano é 4,05 kg, então a potência dissipada por kg é cerca de 56 W/kg, que é adequada para a mistura em uma escala de 10 microns (a taxa de fluxo exemplificativa é suficiente para infundir 18 m³ em 1,8 horas).

[086] Em modalidades preferenciais, o tempo de infusão é de cerca de 1 minuto a cerca de 1 hora. Os experimentos mostraram que a eficiência de conversão de açúcares é relativamente insensível ao tempo de infusão.

[087] Em modalidades preferenciais, o tempo de fermentação é de cerca de 6 horas a cerca de 7 dias. Os experimentos mostraram que o tempo de fermentação com uma concentração de levedura de cerca de 2 células por célula de parênquima resulta no tempo de fermentação de cerca de 6 horas a 20 horas, dependendo do tipo de parênquima de planta rica em carboidrato.

[088] Em modalidades preferenciais, a pressão de fermentação é a pressão atmosférica. Uma vez que o CO₂ é continuamente produzido, e uma vez que os reservatórios de pressão são caros e perigosos, ventilar CO₂ na pressão atmosférica é menos caro.

[089] Em algumas modalidades, o processo compreende adicionalmente manter o tecido de parênquima de planta rico em carboidrato em um ambiente anaeróbico por um tempo de preservação de cultura agrícola subsequente à conclusão do tempo de fermentação. Quando o ambiente for anaeróbico e não houver açúcares simples no apoplasto ou células de parênquima, os fungos e bactérias não podem se desenvolver na pectina ou etanol.

[090] Em modalidades preferenciais, o processo compreende adicionalmente recuperar os produtos de fermentação através de separação a vácuo. Em algumas modalidades, o processo compreende adicionalmente recuperar os produtos de fermentação através de trituração. Em algumas modalidades, o processo compreende adicionalmente drenar a solução de reagente aquosa, antes da etapa (e) ou em seguida à etapa (e).

[091] A separação a vácuo é preferencial devido ao fato de ser uma técnica eficaz e com boa relação custo/benefício para recuperar produtos de fermentação. A separação a vácuo de etanol pode ser feita com um reservatório semelhante como infusão a vácuo, mas com a capacidade adicionada para aquecer a cultura agrícola. A drenagem da solução de reagente aquosa resulta em uma porcentagem mais alta de etanol no vapor separado.

[092] Uma pessoa de habilidade comum na técnica irá reconhecer que o aumento de temperatura durante a fermentação pode ser limitado a cerca de 38 °C com uma variedade de técnicas de baixo custo, especialmente se a fermentação ocorrer sobre aproximadamente 20 horas.

[093] Uma pessoa de habilidade comum na técnica irá reconhecer que o aparelho conhecido pode ser empregado para os processos, sistemas e métodos revelados no presente documento. Os processos no presente documento podem ser em batelada, contínuos, semicontínuos ou pseudocontínuos. Qualquer referência à "reservatório" ou "reator" no presente documento deve ser interpretada para significar um ou uma pluralidade de tal aparelho (como em série ou em paralelo). Vários padrões de fluxo podem ser desejados ou observados. Com reações químicas e processo de transferência de massa simultâneo que envolvem diversas fases, a dinâmica de fluidos pode ser um tanto complexa. Dependendo do projeto específico, os padrões de fluxo podem abordar o fluxo pistonado ou fluxo bem misturado.

[094] A produtividade ou a capacidade de processo, pode variar amplamente de pequenas unidades em escala de laboratório para biorrefinarias em escala comercial total, inclusive qualquer piloto, demonstração ou escala semicomercial. Em várias modalidades, a capacidade do processo é pelo menos cerca de 1 kg/dia, 10 kg/dia, 100 kg/dia, 1 ton/dia (todas as toneladas são toneladas métricas), 10 tons/dia, 100 tons/dia, 500 tons/dia, 1.000 tons/dia, 2.000 tons/dia ou maior.

[095] O sistema geral pode estar em um local fixo ou pode ser tornado portátil. O sistema pode ser

construído com o uso de módulos que podem ser simplesmente duplicados para o aumento em escala prático.

[096] As várias sondas podem permitir o monitoramento de processo preciso e controle através de vários estágios do processo, até e potencialmente incluindo todos os estágios do processo. O monitoramento do processo preciso seria esperado para resultar em aprimoramentos de rendimento e eficiência, tanto dinamicamente quanto em um período de tempo quando o histórico operacional puder ser utilizado para ajustar as condições de processo (inclusive programas de ciclo de pressão). Em algumas modalidades, uma sonda de reação é disposta em comunicação operável com uma zona de processo. Tal sonda de reação pode ser útil para extrair amostras de líquido e analisá-las, a fim de determinar a extensão da hidrólise, ou perfis de açúcar, etc. Os ajustes do processo podem se basear em medições, se julgado necessário ou desejável, com o uso de princípios bem-conhecidos do controle de processo (retorno, avanço, lógica derivativa integral proporcional, etc.).

[097] O sólido, líquido e correntes de gás produzidos ou existentes dentro do processo podem ser independentemente reciclados, passados para etapas subsequentes ou removidos/purgados do processo em qualquer ponto.

EXEMPLOS

[098] Os exemplos a seguir demonstram princípios desta invenção. A infusão a vácuo de levedura e enzimas descritas acima foi mostrada, através de evidência experimental, como útil para fermentar culturas agrícolas ricas em carboidrato.

[099] O aparelho experimental da Figura 1 é projetado para reproduzir a funcionalidade de processo industrial quanto à temperatura, pressão e controle de fluxo de uma unidade industrial. O mesmo difere de uma unidade industrial no carregamento e não carregamento da cultura agrícola (a amostra). O aparelho experimental é usado em todos os exemplos abaixo.

[0100] Com referência à Figura 1, o aparelho experimental 100 consiste em um reservatório de infusão principal 102, que em operação é mantido quase completamente imerso dentro de um banho termostático 101 que pode operar em uma ampla gama de temperaturas e cujo controle de temperatura preciso é garantido por um controlador de temperatura 114. O reservatório de infusão 102 é fechado com uma tampa removível e vedada 118. O reservatório de infusão 102 e a tampa vedada 118 são projetados para ter a capacidade de conter e sustentar as condições a vácuo conforme necessário pelas condições de processo. A quantidade desejada de material de amostra 117 pode ser colocada dentro do reservatório de infusão 102. O reservatório de infusão 102 pode ser abastecido com CO₂ por meio de um cilindro de CO₂ 106 e um duto de CO₂ 107. No duto de CO₂ 107, um regulador de fluxo/pressão 108 é usado para definir a pressão na qual o CO₂ é liberado para o reservatório de infusão 102. Uma bomba de vácuo 103 é usada para evacuar e manter o vácuo dentro do reservatório de infusão 102. Um indicador de pressão 116 e indicador de temperatura 119 são instalados no reservatório de infusão 102. O reservatório de infusão 102 é conectado através de uma válvula de porta 109 a um recipiente 105 com solução de reagente aquosa preparada. A bomba de vácuo 103 é

conectada ao reservatório de infusão 102 por meio de um duto em que um regulador de pressão 110 é instalado. O regulador de pressão 110 permite que a pressão do reservatório de infusão 102 seja regulada em uma ampla gama de níveis de vácuo, enquanto a bomba de vácuo 103 é operada em velocidade constante. Um respiro 112 no regulador de pressão 110 é conectado a um contador de gás. Uma válvula de quatro vias 104 na saída de gás do reservatório de infusão 102 permite que se remova amostras da porta de amostra 111, isole o reservatório de infusão 102, circule a pressão 116, e recircule parte da amostra de volta para o reservatório de infusão 102 sem alterar a pressão e a composição de tampa de gás dentro do mesmo.

[0101] O procedimento experimental para os Exemplos mostrados é conforme segue. A solução de reagente aquosa pré-misturada é preparada separadamente de acordo com as necessidades específicas do experimento; opcionalmente a solução de reagente aquosa pode ser pré-aquecida até uma temperatura de interesse. A amostra de cultura agrícola é colocada dentro do reservatório de infusão 102. Nenhum líquido está presente no reservatório de infusão 102. O reservatório de infusão 102 é colocado em banho termostático 101, que opera na temperatura definida para o experimento. Uma vez que a tampa 118 é colocada no topo do reservatório de infusão 102, com o uso da bomba de vácuo 103 e de CO₂ do duto 107, qualquer ar é expulso e uma atmosfera de CO₂ é formada no topo da amostra. Uma vez que a expulsão de qualquer ar residual é garantida, o fluxo de CO₂ novo do duto 107 é interrompido através da operação no controlador de fluxo 115. A pressão no reservatório de infusão 102 é permitida a cair

até o nível definido no experimento através do controle da mesma por meio do regulador de pressão 110.

[0102] Uma vez que a pressão e a temperatura são estabilizadas no nível desejado, o líquido livre que foi expelido da cultura agrícola quando a pressão caiu é opcionalmente escoada do reservatório com o uso da porta de amostra 111 e guardada para análise adicional. Então, a válvula de porta 109 é aberta e a solução de reagente aquosa pré-misturada é permitida a entrar no reservatório de infusão 102 onde a infusão ocorre. A quantidade de material de amostra é definida de tal modo que, dependendo da densidade aparente do material, a amostra é completamente submersa uma vez que o abastecimento do líquido é interrompido. Selecionando-se com precisão a temperatura e a pressão, a ebulição do líquido pode ser evitada (a ebulição ocasiona grande liberação de bolhas de gás). Após a infusão ser concluída e a válvula de porta 109 ser fechada, uma pressão parcial de 1,0 atm de CO₂ é estabelecida abrindo-se e regulando-se o controlador de fluxo e pressão 108.

[0103] Uma vez que o líquido foi infundido na cultura agrícola a uma pressão de 1,0 atm pelo tempo desejado, o líquido livre é opcionalmente drenado para fora do reservatório com o uso da porta de amostra 111.

[0104] O experimento pode, então, prosseguir pela duração desejada. Se uma amostra de líquido for necessária durante o experimento, uma seringa pode ser conectada à porta de amostra 111 da válvula de quatro vias 104 que é definida de modo a permitir que a seringa seja cheia com líquido. Qualquer líquido residual escoar de volta para o reservatório através da tubulação da válvula de quatro

vias uma vez que a seringa é removida e a porta de amostra 111 é fechada.

[0105] O progresso da fermentação é medido através do gás produzido no respiro 112 com um MilliGascounter, tipo MGC-1, da Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG em Bochum, Alemanha. A quantidade de gás produzida é medida na resolução de mililitros no periódico da fermentação. A fermentação de 3,35 g de açúcar (normalmente sacarose) gera 1 l de gás (CO_2), então, a quantidade de açúcar fermentado, a taxa de fermentação e a quantidade total de açúcar fermentado pode ser inferida pelo gráfico de gás produtor pelo tempo.

[0106] Os exemplos a seguir usam a beterraba sacarina do norte da Minnesota, a cana-de-açúcar da Flórida e o sorgo doce do Tennessee. O suco de cada um foi espremido e o teor de açúcar em Brix foi medido com um refractômetro digital. As amostras de cada um foram bem secas para determinar a porcentagem de sólidos secos. Esses foram combinados para calcular a porcentagem (p/p) de açúcares nessas culturas agrícolas.

[0107] Nota-se que a medição de Brix de suco de sorgo doce foi ajustada multiplicando-se por cerca de 0,8 para obter a porcentagem em peso de açúcares totais. Isso é devido ao fato de que o suco de sorgo doce tem mais glicose e frutose do que a beterraba sacarina ou o suco de cana-de-açúcar, e o índice de refração de glicose e frutose difere daquele de sacarose. Isso é descrito por Liu et al. no documento "Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation", Renewable Energy

33.5 (2008): 1.130 a 1.135, que é incorporado ao presente documento a título de referência.

[0108] A beterraba sacarina foi computada para ter 18% de açúcar em peso, a cana-de-açúcar era 14% de açúcar em peso e o sorgo doce era 10% de açúcar em peso.

EXEMPLO 1: INFUSÃO DE ÁGUA EM TECIDO DE PARÊNQUIMA DE BETERRABA SACARINA

[0109] Os pedaços de beterraba sacarina foram cortados radialmente em três espessuras diferentes, 6 mm, 12 mm e 18 mm. Esses pedaços foram, então, cortados em pedaços quadrados de 25 mm, e todos os pedaços quadrados de 25 mm, para cada uma dessas três espessuras, foram pesados e colocados em três dos aparelhos descritos acima (Figura 1). A tampa de gás era ar para esse exemplo.

[0110] Na Fase 1, um vácuo de 13 kPa foi aplicado por 30 minutos, a água livre foi removida, a pressão foi restaurada para 100 kPa e cada cubo foi pesado.

[0111] Na Fase 2, um vácuo de 13 kPa foi aplicado por 30 minutos, a água foi infundida sob vácuo até que o cubo fosse coberto, a pressão foi restaurada para 100 kPa, a água infundida no tecido de parênquima por 30 minutos, a água livre foi removida e, então, cada cubo foi pesado.

[0112] Na Fase 3, um vácuo de 13 kPa foi aplicado por 30 minutos, a água livre foi removida, a pressão foi restaurada para 100 kPa e cada cubo foi pesado.

[0113] O resultado desse teste foi mostrado na Tabela 1 abaixo, e esse resultado mostra que cerca de 10% da massa do tecido de parênquima escoado do tecido quando um vácuo foi aplicado por 30 minutos. Isso também mostra que cerca de 6% da massa do tecido de parênquima poderia ser

infundida com água sob vácuo, e que cerca de metade dessa escoou do tecido quando um vácuo foi aplicado novamente. Mais significativamente, esse exemplo mostra que a infusão era quase idêntica no tecido com 6 mm de espessura e no tecido de 18 mm de espessura.

TABELA 1: MASSA DE PEDAÇOS DE BETERRABA SACARINA

Espessura	Massa inicial	Massa da Fase 1	Massa da Fase 2	Massa da Fase 3
6 mm	5,985 g	5,389 g	5,695 g	5,604 g
12 mm	8,987 g	8,358 g	8,761 g	8,312 g
18 mm	14,782 g	13,194 g	14,32 g	13,557 g

EXEMPLO 2: FERMENTAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR

[0114] A cana-de-açúcar cortada foi infundida com uma solução de levedura ligeiramente ácida enriquecida com nutrientes ricos em nitrogênio (Fermax da BSG Corporation). Duas soluções diferentes foram testadas em duplicata, uma com o uso de levedura Thermosacc e uma com o uso de levedura Distillamax. Ambas as leveduras estão comercialmente disponíveis junto à Lallemand Biofuels & Distilled Spirits e se diferem no tamanho médio dos corpos celulares. A levedura Thermosacc tem um diâmetro de célula médio de 5 microns, e a Distillamax tem um diâmetro de célula médio de 10 microns. Após a infusão ser concluída, a produção de dióxido de carbono foi monitorada através dos contadores de gás para estimar o progresso da fermentação. O procedimento a seguir foi usado:

1. Começar o aquecimento de banho termostático a 38 °C.

2. Pesar aproximadamente 50 g de cana-de-açúcar, então, cortar em pedaços de aproximadamente 2,54 cm (uma polegada), pesando a quantidade total de cana novamente após o corte.

3. Preparar duas soluções de levedura, uma com 5 g/l de levedura Distillamax, 1 g/l de nutrientes de Fermax e uma com 5 g/l de levedura Thermosacc (C6), 1 g/l de nutrientes de Fermax, tamponando ambas até um pH de 3,5 com ácido fosfórico.

4. Colocar a cana-de-açúcar em béqueres vedados no banho termostático e aplicar vácuo por 30 min. para garantir a evacuação de gás completa da biomassa.

5. Infundir aproximadamente 200 g da solução para cada béquer.

6. Restaurar lentamente a pressão atmosférica criando uma tampa de gás inerte no topo do conteúdo do béquer.

7. Abrir a válvula de ventilação de gás para deixar que o gás flua através dos medidores de fluxo de gás.

8. Deixar a fermentação executar até a conclusão enquanto registra o fluxo de gás.

[0115] As amostras com levedura Thermosacc e levedura Distillamax foram executadas em duplicata e os resultados com o mais alto rendimento de gás foram apresentados na Tabela 2. Ambas as fermentações demoraram um pouco menos do que 8 horas para concluir.

[0116] Em ambos os casos, a infusão permite que a fermentação ocorra dentro do corpo da cana-de-açúcar com pré-processamento mínimo do substrato apesar de uma redução de tamanho grosso. Surpreendentemente, as menores células de

levedura parecem mais eficazes garantindo uma conversão maior de açúcar conforme demonstrado pela produção de gás maior. Esse resultado é consistente com a levedura menor que tem a capacidade de se difundir mais profundamente dentro do apoplasto da cana-de-açúcar. Em ambos os casos, a infusão a vácuo permite a fermentação in-situ ativa, conforme mostrado na Tabela 2.

TABELA 2: EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Amostra	Peso de amostra (g)	Teor de açúcar (g)	Produção teórica de CO ₂ (l)	Produção real de CO ₂ (l)	Rendimento
Thermosacc	44,10	6,17	1,84	1,80	97,8%
Distillamax	43,10	6,03	1,80	1,20	66,6%

EXEMPLO 3: FERMENTAÇÃO DE BETERRABA SACARINA

[0117] Os pedaços de beterraba sacarina cortados de modo grosso foram infundidos com uma solução de levedura ligeiramente ácida produziram levedura Distillamax através da Lallemand Biofuels & Distilled Spirits. Os tempos de infusão diferentes foram usados para cada amostra. Após a infusão ser concluída, a produção de dióxido de carbono foi monitorada pelos contadores de gás para estimar o progresso da fermentação. O procedimento a seguir foi usado:

1. Garantir que o banho termostático seja em 38 °C.
2. Pesar aproximadamente 100 g de beterrabas sacarinas, então, cortá-las em pedaços em cubos de aproximadamente 2,54 cm (uma polegada), pesando a beterraba

total novamente após o corte.

3. Preparar a solução de levedura com 5 g/l de levedura Distillamax, tamponando até um pH de 3,5 com ácido fosfórico.

4. Na solução para as amostras 2 e 4, adicionar uma enzima com atividade de pectinase em um carregamento de cerca de 5 g por kg da biomassa seca.

5. Colocar a amostra de beterraba sacarina nos béqueres vedados no banho termostático e aplicar vácuo por 30 min.

6. Infundir solução suficiente para submergir todos os pedaços de beterraba.

7. Liberar pressão instantaneamente para as amostras 1 e 2 e lentamente (cerca de 5 minutos) para as amostras 3 e 4.

8. Conectar-se aos contadores de gás.

9. Deixar a fermentação ser executada até a conclusão.

[0118] O tamanho de amostra e a quantidade de gás produzida através da fermentação de cada uma dessas 4 amostras de beterraba sacarina foram apresentados na Tabela 3. Todas as fermentações duraram entre 13 e 15 horas até a conclusão. O tempo de infusão não tem um impacto significativo no rendimento de conversão de açúcar geral, uma vez que esse rendimento está acima de cerca de 90% para os casos de infusão rápida (amostras 1 e 2). A infusão lenta parece ser ligeiramente prejudicial. A adição de enzima pectinase - que quebra a parede celular - parece aprimorar a fermentação e ilustra adicionalmente a habilidade de infusão a vácuo para liberar in situ a atividade enzimática e

microbiológica sem a misturação mecânica e o pré-processamento mínimo da biomassa.

TABELA 3: EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO DE BETERRABA SACARINA

Amostra	Peso de amostra (g)	Teor de açúcar (g)	Produção teórica de CO ₂ (l)	Produção real de CO ₂ (l)	Rendimento
1	92,623	16,67	4,98	4,50	90,4%
2	91,826	16,53	4,93	4,75	96,2%
3	92,269	16,61	4,96	4,40	88,7%
4	90,944	16,37	4,89	4,48	91,6%

EXEMPLO 4: FERMENTAÇÃO DE SORGO DOCE

[0119] O mesmo procedimento para fermentar sorgo doce foi usado como no Exemplo 2 acima. Em vez de variar o tipo de levedura, a levedura *Thermosacc* foi usada para ambas as amostras. Uma amostra drenou o líquido dos caules após a infusão, e a outra não drenou o líquido.

[0120] Os resultados dessas fermentações são apresentados na Tabela 4. Ambas as fermentações demoraram um pouco menos do que 20 horas para concluir.

[0121] Surpreendentemente, a eficiência da fermentação com o líquido drenado dos caules é maior do que a eficiência de deixar o líquido ao redor dos caules. Em ambos os casos, no entanto, a infusão a vácuo permite a fermentação in-situ ativa.

TABELA 4: EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO DE SORGO DOCE

Amostra	Peso de amostra (g)	Teor de açúcar (g)	Produção teórica de CO ₂ (l)	Produção real de CO ₂ (l)	Rendimento
Drenado	51,1	5,11	1,53	1,52	99,3%
Não drenado	52,0	5,20	1,55	1,33	85,8%

EXEMPLO 5: FERMENTAÇÃO DE BATATA

[0122] Os pedaços de batata cortados de modo grosso foram infundidos com uma solução de levedura ligeiramente ácida produzida a partir de levedura *Thermosacc* através da Lallemand Biofuels & Distilled Spirits. Uma amostra foi adicionalmente infundida com enzimas α -amilase da BSG Handcraft em Shakopee, MN, EUA. Essa α -amilase tem atividade máxima em 66 °C e cerca de 20% de atividade em 38 °C. Após a infusão ser concluída, a produção de dióxido de carbono foi monitorada pelos contadores de gás para estimar o progresso da fermentação. O procedimento a seguir foi usado:

1. Garantir que o banho termostático seja em 38 °C.
2. Pesar aproximadamente 70 g de batata, então, cortá-las em pedaços em cubos de aproximadamente 2,54 cm (uma polegada), pesando a batata total após o corte.
3. Preparar a solução de levedura com 5 g/l de levedura *Thermosacc*, tamponando até um pH de 3,5 com ácido

fosfórico.

4. Na solução para a amostra 2, adicionar uma enzima com atividade de α -amilase em um carregamento de cerca de 5 g por kg da matéria seca.

5. Colocar a amostra de batata nos béqueres vedados no banho termostático e aplicar vácuo por 30 min.

6. Infundir solução suficiente para submergir todos os pedaços de batata.

7. Liberar a pressão instantaneamente.

8. Conectar-se aos contadores de gás.

9. Deixar a fermentação ser executada por cerca de 120 horas.

[0123] O tamanho de amostra e a quantidade de gás produzida através da fermentação de cada uma dessas 2 amostras de batata foram apresentados na Tabela 5. Aqueles versados na técnica irão reconhecer que há cerca de 0,5% a 2% de açúcares simples (sacarose + glicose) nas células de parênquima, e cerca de 18% de amido na batata, dos quais cerca de 80% do amido pode ser quebrado em glicose, maltose e maltotriose através de α -amilase. A fermentação de ambas as amostras demorou 14,5 horas antes de o gás mensurável ser produzido.

[0124] Sem o desejo de se vincular a qualquer teoria específica, acredita-se que esse tempo de indução longo foi parcialmente ocasionado pela produção de CO_2 inicial que é absorvida na água na batata, e a produção de gás começou quando a água na batata foi saturada com CO_2 . Aqueles versados na técnica irão reconhecer que a solubilidade do CO_2 em água a 38 °C é cerca de 1,6 g/l, que 0,076 l de tecido de batata contém cerca de 0,608 l de água,

e que cerca de 0,042 l de CO₂ irá dissolver em 0,076 l de batata antes de a primeira bolha aparecer.

[0125] Após 120 horas de fermentação, a amostra 1 produziu 0,155 l de gás e a amostra 2 produziu 1,27 l de gás. A amostra 1 não produziu gás mensurável entre 72 horas e 120 horas, mostrando que todos os açúcares simples no apoplasto e as células de parênquima foram fermentadas e que nenhum açúcar simples adicional foi liberado dos grânulos de amido. Isso mostra que a infusão de levedura irá preservar o tecido de parênquima rico em amido.

[0126] A produção de gás significativamente mais alta na amostra 2 mostra que a α -amilase se difundiu nas células de parênquima e hidrolisou cerca de 40% dos grânulos de amido em açúcares que a levedura poderia fermentar. A produção de gás era contínua através da fermentação de 120 horas, com um declínio lento. Esse exemplo demonstra que essa técnica pode fermentar grânulos de amido dentro das células de parênquima infundindo-se simplesmente a levedura e a amilase, sem infundir a pectinase. O mesmo também mostra que a membrana de célula de parênquima é permeável às enzimas de amilase.

TABELA 5: EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO DE BATATA

Amostra	Peso de amostra (g)	Sacarose + Glicose + Maltose (g)	Produção teórica de CO ₂ (l)	Produção real de CO ₂ (l)	Rendimento
Apenas		0,76	0,227	0,155+0,042	87%

Amostra	Peso de amostra (g)	Sacarose + Glicose + Maltose (g)	Produção teórica de CO ₂ (l)	Produção real de CO ₂ (l)	Rendimento
levedura	76				
Levedura + amilase	74	10,65	3,18	1,27	40%

[0127] Nessa descrição detalhada, foi feita referência à múltiplas modalidades e aos desenhos anexos que são mostrados por meio de modalidades exemplificativas específicas de ilustração da invenção. Essas modalidades são descritas para possibilitar que aqueles versados na técnica pratiquem a invenção, e deve-se compreender que as modificações às várias modalidades reveladas podem ser feitas por um versado na técnica.

[0128] Nos casos em que os métodos e as etapas descritos acima indicam determinados eventos que ocorrem em determinada ordem, aqueles indivíduos de habilidade comum na técnica reconhecerão que a ordem de determinadas etapas pode ser modificada e que essas modificações estão de acordo com as variações da invenção. Adicionalmente, determinadas etapas podem ser realizadas simultaneamente em um processo paralelo quando possível, assim como realizadas em sequência.

[0129] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados neste relatório descritivo são incorporados ao presente por meio de referência em sua

totalidade como se cada publicação, patente ou pedido de patente fosse específica e individualmente apresentado no presente documento.

[0130] As modalidades, variações e figuras descritas acima devem fornecer uma indicação da utilidade e da versatilidade da presente invenção. Outras modalidades que não fornecem todos os recursos e as vantagens estabelecidos no presente documento também podem ser utilizadas, sem se afastar do espírito e do escopo da presente invenção. Tais modificações e variações são consideradas como estando dentro do escopo da invenção definida pelas reivindicações. No caso de conflito nas definições entre a presente revelação e um dicionário ou outra referência, a presente revelação irá prevalecer.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA PRODUIR PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO A PARTIR DE TECIDO DE PARÊNQUIMA DE PLANTA RICO EM CARBOIDRATO, em que os ditos produtos de fermentação são etanol e dióxido de carbono, em que o dito processo é caracterizado por compreender as etapas de:

(a) fornecer tecido de parênquima de planta rico em carboidrato em uma temperatura de cultura agrícola de 5° a 40°C, em que o dito tecido de parênquima contém um apoplasto;

(b) combinar o dito tecido de parênquima de planta rico em carboidrato com uma solução de reagente aquosa em uma temperatura de reagente de 5° a 20°C que contém uma levedura, em que a dita levedura é infundida no dito apoplasto;

(c) expor o dito tecido de parênquima de planta rico em carboidrato a uma pressão de preparação de fase gasosa por um tempo de preparação, antes da etapa (b) ou seguindo a etapa (b), em que a dita pressão de preparação de fase gasosa é menor do que a pressão atmosférica;

(d) expor o dito tecido de parênquima de planta rico em carboidrato a uma pressão de infusão de fase gasosa por um tempo de infusão, em que a dita pressão de infusão de fase gasosa é maior do que a dita pressão de preparação de fase gasosa; e

(e) manter uma pressão de fermentação de fase gasosa por um tempo de fermentação para produzir produtos de fermentação dentro do dito tecido de parênquima de planta rico em carboidrato, em que a dita pressão de fermentação de fase gasosa é maior do que a dita pressão de preparação de fase gasosa e em que o rendimento de conversão de açúcar geral em etanol e dióxido de carbono é de pelo menos 40%.

2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dito tecido de parênquima de planta rico em carboidrato ser selecionado a partir do grupo que consiste em caules de cana-de-açúcar, caules de sorgo doce, caules híbridos de milho tropical, tubérculos de beterraba sacarina, maçãs, uvas, laranjas e combinações dos mesmos.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dito tecido de parênquima de planta rico em carboidrato ser selecionado a partir do grupo que consiste em tubérculos de batata, tubérculos de batata doce, tubérculos de mandioca, tubérculos de inhame, tubérculos de alcachofra-girassol e combinações dos mesmos.

4. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela dita solução de reagente aquosa conter enzimas pectinase.

5. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela dita solução de reagente aquosa conter enzimas xilanase.

6. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela dita solução de reagente aquosa conter enzimas amilase.

7. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela dita pressão de preparação de fase gasosa ser de 105% a 200% da pressão de equilíbrio de água na temperatura mais alta dentre a dita temperatura de cultura agrícola e a dita temperatura de reagente.

8. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dito tempo de preparação ser de 1 minuto a 1 hora.

9. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo dito tempo de infusão ser de 1 minuto a 1 hora.

10. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dito tempo de fermentação ser de 6 horas a 7 dias.

11. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela dita pressão de fermentação ser a pressão atmosférica.

12. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, sendo que o dito processo é caracterizado por compreender adicionalmente manter o dito tecido de parênquima de planta rico em carboidrato em um ambiente anaeróbico por um tempo de preservação de cultura agrícola subsequente à conclusão do dito tempo de fermentação.

13. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, sendo que o dito processo é caracterizado por compreender adicionalmente recuperar os ditos produtos de fermentação através de separação a vácuo.

14. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, sendo que o dito processo é caracterizado por compreender adicionalmente drenar a dita solução de reagente aquosa, seja antes da etapa (e) ou em seguida à etapa (e).

FIG. 1

