



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

(11) BR 112016012142-2 B1



(22) Data do Depósito: 11/12/2014

(45) Data de Concessão: 24/05/2022

(54) Título: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÓLEO UNICELULAR A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

(51) Int.Cl.: C12P 19/02; C12P 19/14; C12P 7/64.

(30) Prioridade Unionista: 11/12/2013 EP 13196743.2.

(73) Titular(es): NESTE OYJ.

(72) Inventor(es): HEIDI VAINIO; MIKA SIPPONEN; SIMO LAAKSO; OSSY PASTINEN; ILKKA LEHTOMÄKI; HEIDI KAHELIN; PERTTU KOSKINEN; MIIA LAAMANEN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2014077462 de 11/12/2014

(87) Publicação PCT: WO 2015/086780 de 18/06/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/05/2016

(57) Resumo: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÓLEO UNICELULAR A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS. A presente invenção refere-se a métodos de produção de lipídeos microbianos. Em particular, a presente invenção refere-se a métodos de produção de lipídeos microbianos usando inibidores obteníveis a partir de materiais lignocelulósicos para suprimir a proliferação de micro-organismos indesejados no caldo de fermentação. Portanto, o método da invenção reduz o risco de micróbios contaminantes se estabelecerem no sistema e no cultivo e, dessa forma, rendimentos mais altos de lipídeos microbianos podem ser obtidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÓLEO UNICELULAR A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a métodos para produzir lipídeos microbianos. Em particular, a presente invenção refere-se a métodos para produzir lipídeos microbianos usando inibidores obteníveis a partir de materiais lignocelulósicos para suprimir a proliferação de micro-organismos indesejados no caldo de fermentação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A lignocelulose é o biopolímero mais abundante na Terra. Lignocelulose é o principal componente estrutural de plantas lenhosas e plantas não lenhosas como grama. A biomassa lignocelulósica se refere à biomassa de planta que é composta de celulose, hemicelulose e lignina. Grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são produzidas através de siveicultura, indústrias de madeira e papel e celulose e práticas agrícolas (palha, resíduos, bagaço, palhiço) e muitas agroindústrias. Também, resíduos municipais contêm frações que podem ser consideradas como resíduos de lignocelulose, como resíduo de papel ou papelão, resíduos de jardim ou madeira residual de construção. Devido à alta abundância e baixo preço, os resíduos lignocelulósicos são materiais preferenciais para a produção de biocombustíveis. Além disso, culturas energéticas lenhosas ou herbáceas dedicadas com produtividade de biomassa ganharam interesse como uso de biocombustível.

[003] A produção de biocombustíveis, especialmente etanol, de materiais lignocelulósicos por fermentações microbianas foi estudada extensivamente. O maior desafio para a utilização de lignocelulósicos para a produção microbiológica de biocombustíveis ou matérias-primas de biocombustível está na complexidade do material lignocelu-

lósico e em sua resistência à biodegradação. Em lignocelulose, as fibras de celulose (20 a 50% de peso seco de planta) são incorporadas em matriz covalentemente ligada de hemicelulose (20 a 40%), pectina (2 a 20%) e lignina (10 a 20%) formando uma estrutura muito resistente para biodegradação. Além disso, os resíduos de açúcar de hemicelulose contêm uma mistura variada de hexoses (por exemplo, glicose, manose e galactose), e pentoses (por exemplo, arabinose e xilose) dependendo da biomassa.

[004] O pré-tratamento de material lignocelulósico com alto rendimento a açúcares que são utilizáveis por micro-organismos representa um dos maiores desafios. Reduções de custo significativas são necessárias nos custos de enzimas necessárias em hidrólise de polímeros de açúcar para monômeros de açúcar que são utilizáveis por micro-organismos desejados. Além disso, a produção economicamente viável de biocombustíveis de materiais lignocelulósicos exige uma conversão eficiente de todos os constituintes de carboidrato principais desse material complexo para biocombustíveis.

[005] A hidrólise enzimática do material lignocelulósico é tipicamente realizada em uma etapa separada de processo de produção de biocombustível por enzimas comerciais compradas e produzidas fora do processo de produção de biocombustível real.

[006] Determinados micro-organismos podem produzir lipídeos a partir de moléculas orgânicas, como açúcares derivados de lignocelulose. Determinados micro-organismos, tipicamente, levedura, fungos ou bactérias, podem converter eficientemente tanto açúcares C6 como C5 em materiais lignocelulósicos para óleo. O óleo produzido por micro-organismos heterotróficos é geralmente denominado óleo unicelular ou óleo microbiano. O processo de produção de óleo unicelular usando micro-organismos heterotróficos compreende cultivar micro-organismos em biorreatores aerados, permitindo que as células acu-

mulem lipídeos, colhendo células ricas em lipídeo e recuperando óleo de células. Os lipídeos à base de micro-organismo (isto é, óleo unicelulares) podem ser usados como matérias-primas para a produção de biocombustíveis como biodiesel, diesel renovável ou biocombustível para motores a jato.

[007] Hidrolisados lignocelulósicos também foram utilizados na produção de óleos unicelulares. A hidrólise de lignocelulose foi tipicamente realizada por pré-tratamento do material lignocelulósico para açúcares monoméricos antes de alimentação para bioprocessos.

[008] A publicação de patente US2009217569 descreve a produção de óleo unicelular a partir de vários hidrolisados lignocelulósicos e outros hidrolisados de materiais, como palha, madeira, resíduos industriais de papel e celulose, fibras recicladas, resíduo municipal, biomassa de algas. A fabricação de biocombustível compreende tratar o material de origem com água, ácido ou álcali e contatar o filtrado ou precipitado com micro-organismo produtor de lipídeo. A publicação de patente US2009064567 descreve a produção de óleo unicelular a partir de hidrolisados de material de celulose para produção de biodiesel e biocombustível de jato por Stramenopiles. O documento US20090011480 descreve a produção de óleo unicelular por algas e fungos heterotroficamente desenvolvidos a partir de materiais lignocelulósicos despolimerizados, como palha, madeira, resíduos de fábrica de celulose, painço amarelo. O documento CN101148630 descreve a produção de óleo unicelular a partir de hidrolisados de hemicelulose de palha de trigo, milho ou arroz, obtidos por explosão de vapor, por bactérias ou fungos.

[009] Além disso, na técnica anterior foi descrita a produção de lipídeo diretamente a partir de açúcares poliméricos em lignocelulose, como xilano por Fall et al. (1984), ou celulose por Lin et al. (2010).

[0010] O documento W02010042842 descreve a produção de óleo

unicelular a partir de hidrolisados de lignocelulose por cultura mista de micro-organismo(s) com a capacidade de degradar açúcares poliméricos em lignocelulose e pelo menos uma espécie de alga. A cultura é desenvolvida em cultivos aeróbicos e anaeróbicos sucessivos, em que ácidos graxos são produzidos a partir de açúcares e a partir de produtos de fermentação anaeróbica.

[0011] O documento W02010006228 descreve a produção sequencial de biocombustíveis a partir de lignoceluloses. Em um primeiro estágio, a fermentação anaeróbica com organismos capazes de produzir álcoois a partir de açúcares poliméricos em hidrolisados de lignocelulose, em um segundo estágio, o meio de cultura residual, possivelmente contendo pelo menos um produto de fermentação, é tratado com algas para acumular óleos unicelulares.

[0012] A presença de micróbios não produtores de lipídeos contaminantes em caldo de fermentação pode influenciar a produtividade e rendimento de óleo visto que o micróbio não produtor de lipídeos compete com micro-organismos produtores de óleo (micróbios oleaginosos) em açúcares nos hidrolisados de lignocelulose e, dessa forma, tornando o processo menos viável.

[0013] Portanto, há a necessidade de um método para controlar cultura de micro-organismos no processo de produção de óleo unicelular de modo que a proliferação dos micróbios oleaginosos seja favorecida sobre a proliferação de micróbios não oleaginosos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0014] A produção de óleo unicelular é tipicamente executada cultivando-se micróbios produtores de lipídeo (micróbios oleaginosos) sob condições aeróbicas na presença de um substrato adequado como açúcares lignocelulósicos, como açúcares hemicelulósicos, obtidos por fracionamento de lignocelulose. O fermentador aeróbico médio tem um volume e capacidade muito menores que os fermentadores anaeróbi-

cos e é mais dispendioso para ser executado. Por conseguinte, as demandas de cultivo eficiente são maiores para a produção de óleo unicelular que dependem de cultivo sob condições aeróbicas. A contaminação do cultivo com micróbios que não produzem lipídeos ou apenas lipídeos em baixas quantidades pode reduzir significativamente o rendimento e produtividade de óleo unicelular. Portanto, a presença de micróbios contaminantes durante o cultivo deve ser evitada.

[0015] Um objetivo da presente invenção é, portanto, fornecer um método para a produção de óleo unicelular que deplete ou reduza a quantidade de micróbios não produtores de lipídeos contaminantes no cultivo e, dessa forma, favorecer as proliferações de micróbios oleaginosos.

[0016] O fracionamento de lignocelulose tipicamente produz fração de hemicelulose que contém altas concentrações de compostos inibidores, tipicamente compostos fenólicos. Na produção de óleo unicelular, soluções de açúcar altamente concentradas (xaropes) são tipicamente exigidas. Dessa forma, os hidrolisados de hemicelulose precisam ser concentrados. Os inibidores não voláteis são concentrados em hidrolisado quando o líquido é concentrado por evaporação.

[0017] Os produtos de degradação são gerados no processo de fracionamento de lignocelulose. Alguns desses produtos de degradação atuam como inibidores microbianos (como compostos fenólicos, ácidos orgânicos, furfural e hidróximetilfurfural). Os inventores constataram que por ajuste da concentração desses inibidores microbianos de acordo com a tolerância dos micróbios oleaginosos ao dito inibidor, a proliferação dos micróbios não produtores de lipídeos contaminantes pode ser suprimida.

[0018] Consequentemente, um primeiro aspecto da presente invenção se refere a um método para produzir lipídeos, compreendendo as seguintes etapas

(i) fornecer um meio de cultivo compreendendo um hidrolisado lignocelulósico,

(ii) fornecer um caldo de fermentação inoculando-se o meio de cultivo de (i) com um primeiro micróbio, em que o dito primeiro micróbio é um micróbio oleaginoso,

(iii) incubar o dito meio inoculado com o dito primeiro micróbio permitindo o acúmulo,

em que o dito caldo de fermentação compreende pelo menos um inibidor de crescimento microbiano e em que o dito primeiro micróbio é tolerante ao(s) dito(s) inibidor(es) de crescimento microbiano, em que a dita incubação é conduzida sob condições aeróbicas.

[0019] Um segundo aspecto da presente invenção refere-se a um caldo de fermentação que compreende um hidrolisado lignocelulósico, pelo menos um inibidor de crescimento microbiano e um micróbio oleaginoso, em que o dito micróbio oleaginoso é tolerante ao(s) dito(s) inibidor(es) de crescimento microbiano.

[0020] Um terceiro aspecto se refere ao uso do caldo de fermentação da presente invenção em um método para produzir um lipídeo.

[0021] Um quarto aspecto se refere ao uso de uma composição que compreende pelo menos um inibidor de crescimento microbiano em um método para produzir um lipídeo, em que o lipídeo é produzido e se acumula em um micróbio oleaginoso e em que o dito micróbio oleaginoso é tolerante ao dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0022] A Figura 1 apresenta desempenho (peso seco de célula (CDW) (g/l), concentração de ácido graxo (FA) (g/l), peso seco de célula livre de gordura (CDW) (g/l) e teor de ácido graxo (FA) (%) em biomassa microbiana) de fermentação em batelada alimentada com As-

pergillus. oryzae em hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos de palha de trigo.

[0023] A Figura 2 apresenta o rendimento de resíduo sólido de auto-hidrólise de palha de trigo.

[0024] A Figura 3 apresenta a concentração de açúcar solúvel total (g/l, eixo geométrico y esquerdo) e substâncias inibidoras microbianas potencialis; furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e fenólicos solúveis (g/l, eixo geométrico y direito) na fração líquida obtida a partir de auto-hidrólise de palha de trigo a 10% de consistência (g de matéria seca de sólidos de palha/g total).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0025] Para descrever as modalidades da invenção, uma terminologia específica será utilizada por uma questão de clareza. Entretanto, a invenção não é destinada a ser limitada aos termos específicos então selecionados, e será compreendido que cada termo específico inclui todos os equivalentes técnicos que operam de maneira similar para realizar um propósito similar.

[0026] Esta invenção trata da utilização de materiais (lignocelulósicos como uma matéria-prima para a produção de óleos unicelulares. O óleo unicelular produzido pode ser usado como uma matéria-prima para a produção de biocombustíveis, como biodiesel, diesel renovável ou com combustível de jato.

DEFINIÇÕES

INIBIDOR DE CRESCIMENTO MICROBIANO

[0027] No contexto da presente invenção, o termo "inibidor microbiano" ou "composto inibidor" se refere no presente documento como compostos, derivados de material lignocelulósico, isto é, produtos de degradação de lignocelulose que podem inibir o crescimento de microorganismos. Tais compostos são tipicamente gerados em fracionamento de lignocelulose em que açúcares lignocelulósicos são produzi-

dos. Tais compostos incluem, mas não se limitam a, compostos fenólicos (como ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, vanilina, fenol, guaiacol, hidroquinona, catecol, ácido ferúlico, siringaldeído, ácido siríngico), furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácidos orgânicos como (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) e extrativos (ácido caproico, ácido caprílico, ácido palmítico e ácido pelargônio). Os efeitos inibitórios de crescimento desses compostos podem depender de micro-organismo e condições de cultivo. Quando os compostos inibitórios ocorrem em misturas, os mesmos podem ter efeitos cumulativos, isto é, inibem o crescimento microbiano em concentrações mais baixas do que sem a presença de outro(s) composto(s) inibitório(s).

[0028] No contexto da presente invenção, os carboidratos de biomassa lignocelulósica não são incluídos dentro da definição de inibidor microbiano.

[0029] O termo "Níveis otimizados de inibidores de fermentação" se refere no presente documento a uma concentração de compostos inibitórios que permite o crescimento e produção de lipídeo por micro-organismos oleaginosos, porém inibe o crescimento de micro-organismos não oleaginosos contaminantes.

COMPOSTOS AROMÁTICOS, COMPOSTOS FENÓLICOS

[0030] Hidrocarboneto aromático se refere no presente documento a um composto tendo uma estrutura de anel, formado por ligações covalentes entre átomos de carbono, que contém ligações duplas e simples conjugadas alternadas em uma estrutura de anel. Hidrocarboneto aromático também pode se referir a um composto tendo uma estrutura de anel, formado por ligações covalentes entre átomos de carbono e átomos de não carbono, que contém ligações duplas e simples conjugadas alternadas em uma estrutura de anel.

[0031] O termo "composto fenólico" se refere no presente docu-

mento a um composto que compreende pelo menos um grupo hidrocarboneto aromático contendo pelo menos um grupo hidroxila (-OH) diretamente ligado ao grupo de hidrocarboneto aromático. Neste pedido, a concentração de composto fenólico foi medida com análise colorimétrica de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). Tais compostos incluem, mas não se limitam a, compostos fenólicos como álcool p-cumaril, álcool coniferil, álcool sinapil, 4-hidroxiacetofenona, acetovanillona, acetosiringona, 4-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, fenol, guaiacol, siringol, hidroquinona, catecol, 2-metilfenol, 3-metilfenol, 4-metilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,4-dimetilfenol, 4-etilfenol, 3,4-di-hidroxibenzaldeído, 4-metilguaiacol, 4-vinilfenol, 4-etil-2-metilfenol, 4-alilfenol, 3-metoxicatecol, 2,6-dimetóxi-4-metilfenol, álcool vanilílico, homovanilina, ácido homovanílico, 1-(4-hidróxi-3-metoxifenil)etanol, 1-(4-hidróxi-3-metoxifenil)aleno, éster metílico de ácido vanilílico, 4-etil-2,6-dimetoxifenol, 4-metilcatecol, 4-etilguaiacol, 4-propilfenol, 4-vinilguaiacol, álcool 4-hidroxibenzila, 3-hidróxi-2-metil-(4H)-piran-4-ona, 3,5-di-hidróxi-2-metil-(4H)-piran-4-ona, 4-propenilfenol, 2,6-dimetóxi-4-propilfenol, álcool di-hidroconiferil, homosiringaldeído, álcool 3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzílico, 2,6-dimetóxi-4-propenilfenol, 1-(3,5-dimetóxi-4-hidroxifenil)etanol, coniferil aldeído, siringilacetona, éster metílico de ácido siríngico, propiosiringona, siringil vinol cetona, di-hidrosinapil álcool, sinapaldeído, 2,6-dimetoxifenol, 1-(4-hidroxifenil)etanol, eugenol, 5-etilpirogallol, 4-propilguaiacol, 1,4-di-hidróxi-3-metoxibenzeno, isoeugenol, éster metílico do ácido 4-hidroxibenzoico, guaiacilacetona, 2,6-dimetóxi-4-vinilfenol, propiovani-lona, guaiacil vinil cetona, 4-alil-2,6-dimetoxifenol, e incluindo seus possíveis isômeros, lignina oligomérica e/ou polimérica, taninas, polifenóis, misturas de compostos, compostos covalentemente ligados

compreendendo compostos não fenólicos e compostos fenólicos.

[0032] O termo "concentração de compostos fenólicos" significa a concentração de compostos (tipicamente expressa como g/l) em solução aquosa conforme medido com o método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002)

MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

[0033] Os termos "biomassa lignocelulósica" ou "material lignocelulósico" se destina a incluir, mas não se limitar a, plantas lenhosas ou plantas herbáceas não lenhosas ou outros materiais contendo celulose e/ou hemicelulose: Os materiais podem ser resíduos agrícolas (como palha de trigo, palha de arroz, palhiço, cascas, palha de milho, bagaço de cana, pontas e folhas de cana-de-açúcar), culturas energéticas dedicadas (como painço amarelo, *Miscanthus*, *Arundo donax*, capim-amarelo, salgueiro, jacinto de água, cana energética, sorgo energético,), materiais ou resíduos de madeira (incluindo serraria e polpa e/ou resíduos ou frações de fábrica de papel, como hemicelulose, licor de sulfito residual, fibra residual e/ou lodo primário), musgo ou turfa, ou resíduos de papel municipais. O termo material lignocelulósico também compreende materiais com baixo teor de lignina, materiais como biomassa de macroalgas. Além disso, os materiais também compreendem frações de hemicelulose ou celulose de práticas industriais. O termo material lignocelulósico abrange qualquer tipo de fração de celulose. As matérias-primas ou determinadas frações, como hemicelulose e/ou celulose, de matérias-primas de origem diferente, espécies de plantas, ou processos industriais podem ser misturados e usados como matérias-primas para cultivar biomassa de micro-organismo de acordo com essa revelação. Tipicamente, o teor de lignina em lignocelulose é maior que 5%. A biomassa lignocelulósica também pode conter amido, por exemplo, no caso de plantas inteiras.

HIDRÓLISE

[0034] O termo "hidrólise" se refere no presente documento à despolimerização por adição de água em ligações glicosídicas ou ligação de éster de carboidratos não monoméricos a oligômeros de açúcar e monômeros ou ácidos carboxílicos.

HIDROLISADO

[0035] O termo "hidrolisado" ou "material hidrolisado" se refere no presente documento a um material que foi submetido à hidrólise.

HIDROLISADO DE LIGNOCELULOSE

[0036] O termo "hidrolisado de lignocelulose" se refere no presente documento a produtos de hidrólise de material de lignocelulose ou lignocelulósico compreendendo celulose e/ou hemicelulose, oligossacarídeos, mono e/ou dissacarídeos, ácido acético, ácido fórmico, outros ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural, ácido levulínico, compostos fenólicos, outros produtos de hidrólise e/ou degradação formados a partir de lignina, celulose, hemicelulose e/ou outros componentes de lignocelulose, compostos de nitrogênio que se originam de proteínas, metais e/ou fragmentos não hidrolisados ou parcialmente hidrolisados de lignocelulose.

TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

[0037] No contexto da presente invenção, o termo "tratamento hidrotérmico" se refere a tratamento térmico de suspensão de lignocelulose aquosa a temperaturas que excedem 50°C. O tratamento térmico pode ser realizado sob pressão em um reator pressurizado ou em pressão atmosférica em um reator não pressurizado. A pressão em reator pressurizado pode ser gerada por vapor obtido a partir da água quando aquecida até o ponto de ebulição ou por fase gasosa pressurizada adicionada. O tratamento hidrotérmico pode ser realizado na presença de um catalisador ou na ausência de um catalisador. O tratamento hidrotérmico na ausência de um catalisador (também chamado

de "auto-hidrólise" ou "AH") para a hidrólise de biomassa lignocelulósica sem catalisador adicionado quando a suspensão aquosa de biomassa lignocelulósica é submetida a tratamento hidrotérmico a temperaturas que excedem 120°C sob pressão.

[0038] "Palha auto-hidrolisada" se refere no presente documento à fração sólida que foi obtida após a auto-hidrólise. A palha auto-hidrolisada pode ser submetida à lavagem.

EXPLOÇÃO DE VAPOR

[0039] No contexto da presente invenção, o termo "explosão de vapor" se refere a um tratamento, em que o material é aquecido por um vapor de alta pressão (a temperaturas entre 110°C e 250°C, tipicamente 140 a 230°C) sob uma pressão com ou sem a adição de produtos químicos (como ácidos) e o material é mantido à temperatura durante um determinado tempo, após isso, a pressão é liberada causando a descompressão explosiva do material. Nesse contexto, a explosão de vapor é aplicada a materiais lignocelulósicos e a mesma tipicamente resulta em uma ruptura da estrutura rígida das fibras de lignocelulose, isto é, desfibrilação dos feixes de fibras de celulose.

TRATAMENTO DE DESLIGNIFICAÇÃO

[0040] "Tratamento de deslignificação" se refere no presente documento a um tratamento que remove o material sem carboidrato como lignina de biomassa lignocelulósica. O tratamento de deslignificação também se refere a um tratamento que remove tanto material sem carboidrato como de carboidrato como uma mistura de biomassa lignocelulósica.

AGENTE DE DESLIGNIFICAÇÃO ALCALINA

[0041] No contexto da presente invenção, o termo "agente de deslignificação alcalina" se refere a um composto químico ou uma mistura de compostos químicos que quando adicionado à água fornece soluções com uma atividade iônica de hidrogênio menor que aquela de

água pura, isto é, um pH maior que 7,0. O agente de deslignificação alcalina pode ser selecionado a partir de um grupo de compostos que compreende, mas não se limitando a hidróxidos como LiOH (hidróxido de lítio), NaOH (hidróxido de sódio), KOH (hidróxido de potássio), $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (hidróxido de cálcio), NH_4OH (hidróxido de amônio), ou compostos que podem formar íons de hidróxido em água como NH_3 (amônia) em estado líquido ou gasoso, carbonatos como HCO_3^- (íons de bicarbonato), Li_2CO_3 (carbonato de lítio), Na_2CO_3 (carbonato de sódio), K_2CO_3 (carbonato de potássio), sulfetos como Na_2S (sulfeto de sódio), e os hidratos correspondentes.

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

[0042] No contexto da presente invenção, o termo "hidrólise enzimática" se refere a tratamento enzimático do material lignocelulósico que compreende celulose e/ou hemicelulose, oligossacarídeos, em que as enzimas facilitam a hidrólise da celulose e/ou hemicelulose, oligossacarídeos para obter mono e/ou dissacarídeos. Tipicamente, o tratamento de hidrólise enzimática do material lignocelulósico é conduzido submetendo-se o material lignocelulósico em uma mistura de enzimas na presença de água ou um tampão. A mistura de enzimas consiste em, mas não se limita a, 1,4-13-glucanases (endoglucanases e exoglucanases, ou endocelulases e exocelulases), 1,4-13-glucosidases (celobiasas) e enzimas de degradação de hemicelulose (hemicelulases, xilanases, arabinases etc.).

FRAÇÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

[0043] "Fração de biomassa lignocelulósica" se refere no presente documento a qualquer fração que foi derivada de biomassa lignocelulósica e pode ser, dessa forma, livre de lignina.

LIPÍDEO MICROBIANO OU LIPÍDEO

[0044] No contexto da presente invenção, "lipídeo microbiano", "lipídeo" ou "lipídeo intracelular" se refere a uma substância graxa, cuja

molécula geralmente contém geralmente, como uma parte, uma cadeia de hidrocarboneto alifática, que se dissolve em solventes orgânicos não polares, porém é insatisfatoriamente solúvel em água. Os lipídeos são um grupo essencial de grandes moléculas em células vivas. Os lipídeos são, por exemplo, gorduras, óleos, ceras, ésteres de cera, esteróis, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, polihidroxialcanoatos, ácidos nucleicos, ácidos graxos, álcoois graxos, aldeídos graxos, ésteres de ácido graxo, fosfolipídeos, glicolipídeos, esfingolipídeos e acilgliceróis, como triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis.

[0045] Os lipídeos preferenciais na presente invenção são gorduras, óleos, ceras, acilgliceróis e ácidos graxos e seus derivados, em particular triacilgliceróis e ésteres de cera. No contexto da presente invenção, os lipídeos são sintetizados e acumulados em micróbios (lipídeos intracelulares).

[0046] Em conjunto com essa invenção, óleo unicelular é usado como sinônimo para lipídeos e gordura.

[0047] O termo "aciglicerol" se refere a um éster de glicerol e ácidos graxos. Acilgliceróis ocorrem naturalmente como gorduras e óleos graxos. Exemplos de acilgliceróis incluem triacilgliceróis (TAGs, triglicerídeos), diacilgliceróis (diglicerídeos) e monoacilgliceróis (monoglicerídeos).

AÇÚCAR

[0048] No contexto da presente invenção, o termo "açúcar" se refere no presente documento a carboidratos oligoméricos, diméricos e monoméricos. Particularmente, neste pedido, o termo açúcar se refere a carboidratos oligoméricos, diméricos e monoméricos solúveis em água derivados de materiais lignocelulósicos. Pelo termo "açúcares poliméricos" entende-se carboidratos que estão em forma polimérica e não tipicamente solúveis em água.

RENDIMENTO DE AÇÚCAR

[0049] No contexto da presente invenção, o termo "rendimento de açúcar" se refere no presente documento ao rendimento de carboidratos oligoméricos, diméricos e monoméricos a partir de materiais particulares. Particularmente, neste pedido, o termo rendimento de açúcar se refere ao rendimento de carboidratos oligoméricos, diméricos e monoméricos solúveis em água derivados de materiais lignocelulósicos.

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÓLEO UNICELULAR

[0050] "Processo de produção de óleo unicelular" se refere no presente documento a um processo, que compreende as etapas de formar ou permitir o crescimento de um micro-organismo de sintetização de lipídeos e permitindo que a massa de organismo obtida dessa forma produza e/ou armazene (acumule) lipídeo, recuperando as células da fase líquida, e extraíndo ou recuperando os lipídeos das células. Em determinados casos, o óleo unicelular também pode ser extracelular como excretado ou liberado de células em meio de cultura durante ou após o cultivo.

CULTIVO AERÓBICO

[0051] O termo "cultivo aeróbico" ou "fermentação aeróbica" se refere a um cultivo em que o micro-organismo utiliza oxigênio como aceitante de elétron terminal para geração de energia (isto é, o micro-organismo usa respiração aeróbica). Tipicamente em biorreatores, o cultivo aeróbico é realizado adicionando-se oxigênio ou uma mistura de gás contendo oxigênio (tipicamente ar), isto é, o biorreator é aerado. Quando micro-organismos usam respiração aeróbica em cultivo, o mesmo pode ser referido como "cultivo sob condições aeróbicas". Tipicamente, isso ocorre em biorreatores aerados.

OPERAÇÃO ASSÉPTICA

[0052] O termo "operação asséptica" se refere no presente documento à operação em que os sistemas de cultivo de micro-organismos

(por exemplo, fermentador) foram esterilizados antes do cultivo, e em que a operação é realizada de maneira que previna a contaminação (isto é, crescimento de micro-organismos não desejados) de sistemas de cultivo, por exemplo, usando agentes antimicrobianos não derivados de pré-tratamento de lignocelulose. "Operação não asséptica" se refere à operação realizada de forma diferente da "operação asséptica".

MICRÓBIO OLEAGINOSO OU MICRÓBIO PRODUTOR DE ÓLEO

[0053] O micróbio oleaginoso (também referido como organismos produtores de óleo) usado na presente invenção é selecionado a partir do grupo de bactérias, cianobactérias, fungos como leveduras e fungos filamentosos, archaea ou microalgas. Os micro-organismos podem acumular prontamente lipídeos ou foram geneticamente modificados para acumular lipídeos ou aprimorar o acúmulo de lipídeos.

[0054] De preferência, os organismos que são capazes de usar açúcares C6 e C5 são usados. De preferência, os organismos são levedura, fungos filamentosos ou bactérias.

[0055] No contexto da presente invenção, o micro-organismo oleaginoso (micróbio oleaginoso) se refere a um micro-organismo que é capaz de acumular lipídeos intercelulares de modo que os lipídeos equivalham a pelo menos 15% (p/p) da biomassa total (por peso seco de célula) do micróbio quando o mesmo é cultivado sob condições adequados. Em uma modalidade preferencial, o micróbio oleaginoso é capaz de acumular pelo menos 20% (p/p) da biomassa total do micróbio (por peso seco de célula).

[0056] As cepas de micro-organismos preferenciais para os propósitos da presente invenção incluem, mas não se limitam a, espécies e gêneros listados abaixo:

[0057] De acordo com uma modalidade da invenção, o primeiro micróbio é um micróbio oleaginoso capaz de usar açúcares derivados

de materiais lignocelulósicos. De preferência, os organismos oleaginosos são capazes de usar açúcares C6 (seis açúcares de carbono, como glicose, manose e galactose) e açúcares C5 (como xilose e arabinose) em hidrolisados lignocelulósicos. De acordo com uma modalidade da invenção, o organismo oleaginoso é capaz de usar carboidratos poliméricos ou oligoméricos em lignocelulose ou frações dos mesmos.

[0058] As cepas fúngicas preferenciais (filamentosas) são de espécies de gêneros *Aspergillus* como *Aspergillus oryzae*, *Mortierella* como *Mortierella isabellina*, *Chaetomium*, *Claviceps*, *Cladosporidium*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Fusarium*, *Glomus*, *Mucor*, *Pseudozyma*, *Pythium*, *Rhizopus*, como *Rhizopus oryzae*, *Tremella*, *Zygorhynchus*, *Humicola*, *Cladosporium*, *Ma/branchea*, *Umbelopsis* como *Umbelopsis isabellina* e *Ustilago*. As espécies de fungos preferenciais são de gêneros *Aspergillus* e/ou *Mortierella*. Os fungos preferenciais são aqueles fungos capazes de produzir lipídeos efetivamente.

[0059] As cepas de levedura preferenciais são aquelas que pertencem a espécies de gêneros, *Geotrichum*, *Deparyomyces*, *Pachysolen*, *Galactomyces*, *Hansenula*, *Leucosporidium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Waltomyces*, *Cryptococcus*, como *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium*, como *Rhodospiridium toruloides* ou *Rhodospiridium fluviale*, *Rhodotoru/a*, como *Rhodotoru/a glutinis*, *Yarrowia*, como *Yarrowia lipolytica*, *Candida* como *Candida curvata*, *Lipomyces* como *Lipomyces starkeyi* e *Trichosporon* como *Trichosporon cutaneum* ou *Trichosporon pululans*. As leveduras mais preferenciais são de gêneros *Lipomyces*, *Rhodospiridium* e *Cryptococcus*. As leveduras preferenciais são aquelas capazes de produzir lipídeos efetivamente.

[0060] As bactérias preferenciais são aquelas que pertencem à espécie de gêneros *Rhodococcus*, *Acinetobacter* e *Streptomyces*. As bactérias preferenciais são aquelas capazes de produzir lipídeos efetivamente.

[0061] As algas mais preferenciais são microalgas, como espécies de microalgas de gêneros que compreendem *Brachiomonas*, *Cryptocodinium*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Hantzschia*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Prototheca*, *Scenedesmus*, *Schizochytrium*, *Traustochytrium* e *Ulkenia*. As microalgas preferenciais são aquelas microalgas capazes de se desenvolver heterotroficamente e produzir lipídeos efetivamente. Os organismos que pertencem aos gêneros *Schizochytrium*, *Traustochytrium* e *Cryptocodinium* e *Ulkenia* são, às vezes, denominados fungos marinhos.

[0062] De acordo com uma outra modalidade da invenção, os carboidratos de biomassa lignocelulósica estão principalmente em forma monomérica e organismos não capazes de usar carboidratos oligoméricos ou poliméricos são usados para a produção de óleo unicelular. Tais organismos produtores de óleo são selecionados a partir do grupo de bactérias, cianobactérias, fungos como leveduras e fungos filamentosos, archaea ou microalgas. Os micro-organismos podem acumular prontamente lipídeos ou foram geneticamente modificados para acumular lipídeos ou aprimorar o acúmulo de lipídeos.

MASSA UNICELULAR CONTENDO LIPÍDEO

[0063] "Massa unicelular contendo lipídeo" significa uma massa unicelular e micélio celular com um teor de lipídeos de pelo menos preferivelmente 10%, de preferência pelo menos 15% (p/p) ou mais de matéria seca da biomassa de micro-organismo.

RECUPERAÇÃO DE LIPÍDEOS

[0064] "Recuperação de óleo" ou "recuperação de lipídeo" ou "recuperação de lipídeo a partir de um micróbio oleaginoso" se refere a um processo, em que o lipídeo (lipídeo intracelular) é recuperado por métodos mecânicos, químicos, termomecânicos ou autocatalíticos ou por uma combinação desses métodos a partir das células de micro-organismos. Alternativamente, "recuperação de óleo" pode significar a

recuperação de lipídeos extracelularmente produzidos a partir do caldo de cultivo (fermentação).

MASSA CELULAR RESIDUAL

[0065] No contexto da presente invenção, "massa celular residual" se refere a uma fração de material sólido, semissólido ou fluxível, que contém micro-organismos tratados para a recuperação de lipídeos intracelulares.

BIOCOMBUSTÍVEL

[0066] No contexto da presente invenção, "biocombustível" se refere a combustível sólido, líquido ou gasoso principalmente derivado de biomassa ou resíduo biológico e é diferente de combustíveis fósseis, que são derivados de restos orgânicos de plantas e animais pré-históricos.

[0067] De acordo com a diretiva de EU 2003/30/EU "biocombustível" se refere a um éster metílico produzido a partir de óleo vegetal ou óleo de origem animal, de qualidade de diesel que será usado como biocombustível. Mais amplamente, o biodiesel se refere a ésteres de alquila de cadeia longa, como ésteres de metila, etila ou propila, de óleo vegetal ou óleo de origem animal de qualidade de diesel. O biodiesel também pode ser produzido a partir de lipídeos de micro-organismo, com isso, o lipídeo de micro-organismo pode se originar de uma bactéria, um fungo (levedura ou um fungo filamentoso), uma alga ou outro micro-organismo.

DIESEL RENOVÁVEL

[0068] "Diesel renovável" se refere a um combustível que é produzido por um tratamento com hidrogênio de lipídeos de uma origem animal, vegetal ou de micro-organismo, ou suas misturas, com isso, o lipídeo de micro-organismo pode se originar de uma bactéria, um fungo (levedura ou um fungo filamentoso), uma alga ou outro micro-organismo. O diesel renovável também pode ser produzido a partir de

ceras derivadas de biomassa por gaseificação e síntese de Fischer-Tropsch. Opcionalmente, além de tratamento com hidrogênio, isomerização ou outras etapas de processamento podem ser realizadas. O processo de diesel renovável também pode ser usado para produzir combustível para motores a jato e/ou gasolina. A produção de diesel renovável foi descrita nas publicações de patente EP 1396531, EP1398364, EP 1741767 e EP1741768.

[0069] Biodiesel ou diesel renovável podem ser misturados com combustíveis fósseis. Aditivos adequados, como conservantes e antioxidantes podem ser adicionados ao produto de combustível.

LUBRIFICANTE

[0070] "Lubrificante" se refere a uma substância, como graxa, lipídeo ou óleo que reduz o atrito quando aplicado como um revestimento de superfície a partes móveis. Duas outras funções principais de um lubrificante são remoção de calor e dissolução de impurezas. As aplicações de lubrificantes incluem, mas não se limitam a, usos em motores de combustão interna como óleos de motor, aditivos em combustíveis, em dispositivos movidos a óleo como bombas e equipamento hidráulico, ou em tipos diferentes de mancais. Tipicamente, os lubrificantes contêm 75 a 100% de óleo-base e o restante é aditivos. Os aditivos adequados são, por exemplo, detergentes, estabilizadores de armazenamento, antioxidantes, inibidores de corrosão, agentes redutores de turbidez, desemulsificantes, agentes antiespumantes, cossolventes, e aditivos de lubricidade (consulte, por exemplo, o documento US 7.691.792). Óleo-base para lubrificante pode se originar de óleo mineral, óleo vegetal, óleo de origem animal ou de uma bactéria, fungos (levedura ou um fungo filamentoso), uma alga ou outro micro-organismo. Óleo-base também pode se originar de ceras derivadas de biomassa por gaseificação e síntese de Fischer-Tropsch. O índice de viscosidade é usado para ca-

racterizar o óleo-base. Tipicamente, o índice de alta viscosidade é preferencial.

[0071] Os lipídeos produzidos de acordo com o método descrito nesta invenção podem ser usados como matéria-prima para a produção de biodiesel, diesel renovável, combustível para motores a jato ou gasolina. Biodiesel consiste em metil ésteres de ácido graxo e é tipicamente produzido por transesterificação. Em transesterificação, os acilgliceróis são convertidos em ésteres de alquila de ácido graxo de cadeia longa (metila, etila ou propila). Diesel renovável se refere a combustível que é produzido por tratamento com hidrogênio (desoxigenação, hidrogenação ou hidroprocessamento com hidrogênio) de lipídeos. Em tratamento com hidrogênio, acilgliceróis são convertidos em alcanos correspondentes (parafinas). Os alcanos (parafinas) podem ser adicionalmente modificados por isomerização ou por outras alternativas de processo. O processo de diesel renovável também pode ser usado para produzir combustível para motores a jato e/ou gasolina. Ademais, o craqueamento de lipídeos pode ser realizado para produzir biocombustíveis. Além disso, os lipídeos podem ser usados biocombustíveis diretamente em determinadas aplicações.

[0072] Os lipídeos produzidos com o método também podem ser usados como óleos base para lubrificantes (óleos de lubrificação) ou como um material de partida para a produção de óleos base para lubrificantes

MATÉRIA SECA

[0073] "DM" ou "peso seco" se refere no presente documento à matéria seca e é uma medição da massa de um material quando o mesmo é submetido a um tratamento que remove essencialmente água do material (isto é, o material é completamente seco).

CONSISTÊNCIA

[0074] "Consistência" se refere no presente documento à razão de peso seco de sólidos para peso total de suspensão.

MÉTODO PARA PRODUIR UM LIPÍDEO MICROBIANO

[0075] Em um primeiro aspecto da presente invenção, um método para produzir lipídeos, que compreende as seguintes etapas

(i) fornecer um meio de cultivo compreendendo um hidrolisado lignocelulósico,

(ii) fornecer um caldo de fermentação inoculando-se o meio de cultivo de (i) com um primeiro micróbio, em que o dito primeiro micróbio é um micróbio oleaginoso,

(iii) incubar o dito meio inoculado com o dito primeiro micróbio permitindo que os lipídeos se acumulem,

em que o dito caldo de fermentação compreende pelo menos um inibidor de crescimento microbiano e em que o dito primeiro micróbio é tolerante ao(s) dito(s) inibidor(es) de crescimento microbiano, em que a dita incubação é conduzida sob condições aeróbicas.

[0076] O método da invenção também é chamado de um processo de produção de óleo unicelular. O método da presente invenção pode ser parte de processo de produções de biocombustíveis conforme descrito no presente documento, em que o óleo ou pelo menos parte do óleo é fornecido sob a forma de óleo microbiano pelo método descrito no presente documento.

[0077] De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, o meio de cultivo compreende açúcares lignocelulósicos derivados de celulose e/ou hemicelulose. De acordo com a invenção, frações de hemicelulose e/ou celulose de biomassa lignocelulósica são usadas como matérias-primas para a produção de óleo microbiano (óleo unicelular) no mesmo processo (sistema de biorreator). O processo usa, de preferência, micróbios oleaginosos que são capazes de usar tanto

açúcares C6 (por exemplo, glicose, manose, galactose) como C5 (por exemplo, xilose, arabinose).

[0078] De acordo com uma outra modalidade preferencial da invenção, o meio de cultivo compreende açúcares hemicelulósicos derivados de lignocelulose. De acordo com uma outra modalidade da invenção, os açúcares hemicelulósicos estão pelo menos parcialmente sob a forma oligomérica quando alimentados em um processo de produção de óleo unicelular.

[0079] De acordo com uma outra modalidade preferencial da invenção, a fração hemicelulósica é, primeiro, separada de material lignocelulósico. A separação pode ser realizada com qualquer método, de preferência, por tratamento hidrotérmico, auto-hidrólise e/ou explosão a vapor com ou sem a adição de ácidos resultando em uma fração líquida contendo açúcares hemicelulósicos e uma fração sólida contendo celulose e lignina. A fração líquida contém, tipicamente, compostos que inibem o crescimento de micro-organismos, compostos que são produzidos no processo de fracionamento de lignocelulose. Esses compostos são produtos de degradação de lignocelulose, como lignina e açúcares e compreendem compostos fenólicos, compostos de furo (furfural e derivados dos mesmos) e ácidos orgânicos (principalmente ácido acético, ácido fórmico). Também, a fração sólida contendo celulose e lignina contém compostos inibitórios, dependendo da extensão de lavagem. De acordo com a invenção, o meio de cultivo compreende um fluxo de líquido de etapa de fracionamento consistindo em açúcares de hemicelulose que pode ser alimentado para cultivo sem hidrólise enzimática de oligômeros de açúcar, ou alternativamente fluxo de hemicelulose contendo oligômeros de açúcar pode ser alimentado para hidrólise enzimática para produzir monômeros de açúcar antes de serem usados em cultivo microbiano. De acordo com a invenção, a fração de celulose-lignina sólida é alimentada para tratamento

enzimático para dissolver celulose e hemicelulose residual (não dissolvidas na etapa de fracionamento) em monômeros de açúcar para produção de óleo microbiano.

[0080] O lipídeo, tipicamente, se acumula como lipídeos intracelulares dentro do micróbio oleaginoso (chamado de o primeiro micróbio), entretanto, o lipídeo microbiano também pode ser secretado ou pelo menos parcialmente secretado no caldo de fermentação a partir do qual o mesmo pode ser recuperado. Dessa forma, em uma modalidade, o método compreende adicionalmente uma etapa de recuperar o lipídeo acumulado a partir do dito primeiro micróbio (micróbio oleaginoso). Em uma outra modalidade, o lipídeo é recuperado do caldo de fermentação. A recuperação de lipídeo pode ser realizada de várias maneiras conforme discutido neste documento.

[0081] A etapa de incubação (cultivo) (iii) pode ser feita como qualquer cultivo aeróbico adequado incluindo cultivo em batelada, batelada alimentada ou contínua.

[0082] Quando o meio de cultivo, o fermentador (biorreator) ou sistemas conectados aos fermentadores não são esterilizados, culturas de micróbios contaminantes podem se estabelecer. Por isso que quando tais micróbios contaminantes não são micróbios oleaginosos os mesmos podem competir com os micróbios oleaginosos no substrato disponível e, dessa forma, reduzem o rendimento de lipídeo na produção.

[0083] Esses micróbios contaminantes (chamados de um segundo micróbio) são indesejados e devem ser evitados ou suprimidos no sistema. Mediante a introdução de um inibidor microbiano ao qual o micróbio oleaginoso é tolerante, o estabelecimento de micróbios contaminantes (segundo micróbio) evitados ou suprimidos no sistema, em que o último é sensível ou, pelo menos, menos tolerante ao dito inibidor microbiano.

[0084] Quando o hidrolisado lignocelulósico não é esterilizado, o mesmo irá conter, tipicamente, uma ou mais espécies de micróbios não oleaginosos, que são, portanto, indesejados no cultivo e está incluído dentro da definição do segundo micróbio. Dessa forma, em uma modalidade, o dito segundo micróbio é um micróbio não oleaginoso.

[0085] Em uma modalidade da presente invenção, o segundo (micróbio não oleaginoso) é introduzido ou foi estabelecido no sistema de produção, por exemplo, o fermentador e, dessa forma, irá contaminar o caldo de fermentação. Dessa forma, em uma modalidade da invenção, o caldo de fermentação compreende adicionalmente um segundo micróbio, que é intolerante ao dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano. Alternativamente, o segundo micróbio é introduzido durante a preparação para o cultivo, por exemplo, com o hidrolisado lignocelulósico. Consequentemente, em uma modalidade adicional, o segundo micróbio está presente no meio de cultivo fornecido na etapa (i) ou contaminou o caldo de fermentação na etapa (ii) ou (iii) ou presente no biorreator.

[0086] O objetivo da presente invenção é, portanto, evitar que esses micróbios contaminantes (chamados de um segundo micróbio) se estabeleçam no sistema. O processo é realizado introduzindo-se pelo menos um inibidor de crescimento microbiano ao qual o micróbio oleaginoso (primeiro micróbio) é tolerante ou, pelo menos, mais tolerante e o micróbio contaminante (segundo micróbio) é intolerante ou, pelo menos, menos tolerante que o primeiro micróbio.

[0087] É evidente a partir da descrição acima que se o primeiro micróbio for "tolerante" a um inibidor de crescimento microbiano, significa que o dito primeiro micróbio ("o micróbio produtor de óleo", é capaz de se proliferar e/ou produzir óleo mesmo na presença de dito inibidor de crescimento microbiano. Além disso, é evidente que "intolerante" no contexto, por exemplo, de um segundo micróbio (contami-

nante), significa que o dito segundo micróbio será inibido em seu crescimento, como impedido de se proliferar em um meio que compreende uma concentração suficiente de dito inibidor de crescimento microbiano.

[0088] A partir dos métodos e dados descritos na seção de exemplos, também é evidente para o versado na técnica como testar a capacidade de qualquer micróbio produtor de óleo se proliferar e/ou produzir óleo em um nível razoável na presença de um inibidor de crescimento microbiano. E, ainda, também é evidente para o versado na técnica, com base nos métodos e dados apresentados nos exemplos como testar qualquer segundo micróbio (potencialmente contaminante) para determinar o quanto é intolerante ao dito inibidor de crescimento microbiano e, desse modo, qual concentração exata do dito inibidor de crescimento microbiano é necessária no meio para inibir a proliferação (crescimento) de dito segundo micróbio. Portanto, o conhecimento e métodos estão disponíveis para testar a capacidade de um primeiro (micróbio produtor de óleo) superar a contaminação de segundo micróbio sob condições em que o meio compreende um inibidor de crescimento microbiano, em quantidades conforme definido neste pedido, ou conforme definido por experimentos como aqueles descritos na seção de exemplos. Portanto, tolerante significa que o micróbio tolerante é capaz de superar o micróbio intolerante na presença de inibidor de crescimento microbiano.

[0089] Dessa forma, a faixa de tolerância é a faixa de concentração de um determinado inibidor microbiano dentro do qual um primeiro micróbio particular é capaz de se proliferar e produzir óleo em um nível que não se difere em mais que 50% do nível de proliferação ou produção quando o inibidor de crescimento microbiano não está presente no meio.

[0090] Conforme pode ser observado a partir dos métodos e da-

dos apresentados nos exemplos, a faixa de tolerância pode ser facilmente determinada usando esses métodos. Também, "fora da faixa de tolerância" do segundo micróbio simplesmente significa que usar os métodos descritos nos exemplos, o versado na técnica pode determinar se uma concentração de um inibidor de crescimento microbiano está fora da faixa de tolerância de um determinado segundo micróbio. Estar fora da faixa de tolerância significa que tal concentração de um inibidor de crescimento microbiano inibe o crescimento ou proliferação do dito segundo micróbio em pelo menos 20%, como pelo menos 30%, ou 40%, ou pelo menos 50% quando comparado ao mesmo meio sem o dito inibidor de crescimento microbiano.

[0091] O monitoramento da concentração do inibidor de crescimento microbiano e, subsequentemente, o ajuste da concentração do dito inibidor de crescimento microbiano em um reator durante o crescimento ou produção podem ser necessários, visto que alguns microorganismos irão causar tanto um aumento como uma redução nas concentrações, por exemplo, de compostos fenólicos no meio. Portanto, "ajuste da concentração" significa que a concentração será ajustada conformemente para ainda ficar dentro da faixa desejada que é dentro da faixa tolerável para o primeiro micróbio e sem a faixa tolerável para o segundo micróbio.

[0092] Os presentes inventores constataram que os compostos (como compostos fenólicos) presentes no hidrolisado lignocelulósico pode funcionar como inibidores microbianos no método da presente invenção. Dessa forma, em uma modalidade da presente invenção, o dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano está presente no meio de cultivo fornecido na etapa (i), como no hidrolisado lignocelulósico do meio de cultivo. Os compostos inibidores de crescimento microbiano também podem ser adicionados durante o cultivo juntamente com o hidrolisado lignocelulósico, como em cultivo em batelada alimentada.

[0093] De acordo com a presente invenção, o micróbio oleaginoso (primeiro micróbio) é tolerante ou pelo menos parcialmente tolerante ao inibidor microbiano presente durante o cultivo. O segundo micróbio, por outro lado, é intolerante ao inibidor microbiano ou, pelo menos, menos tolerante ao inibidor microbiano que o primeiro micróbio, que permite que a concentração do inibidor microbiano seja ajustada de modo que as condições do micróbio oleaginoso sejam favoráveis sobre aquelas do segundo micróbio.

[0094] Em uma modalidade da presente invenção, o dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano está presente no dito caldo de fermentação em uma concentração dentro da faixa de tolerância do dito primeiro micróbio e fora da faixa de tolerância do dito segundo micróbio. Em uma modalidade adicional, o método compreende adicionalmente uma etapa de adicionar o dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano ou ajustar a concentração do dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano no caldo de fermentação.

[0095] O método da invenção permite uma produção de óleo microbiano eficiente sem a necessidade de esterilizar o meio de cultivo antes de produzir o caldo de fermentação inoculando-se o mesmo com o micróbio oleaginoso. Dessa forma, em uma modalidade da presente invenção, o método não é realizado sob condições assépticas. Em uma modalidade adicional, o meio de cultivo que compreende hidrolisato lignocelulósico fornecido na etapa (i) não foi esterilizado. Em outras palavras, em uma modalidade, o método da invenção é realizado como um processo não asséptico (operação não asséptica).

[0096] A esterilização de biorreatores e o meio de cultivo também exigem mais energia e desenho de reator mais dispendioso em comparação com sistemas de biorreator que não incluem esterilização. Dessa forma, evitar a esterilização pode melhorar a eficiência de custo

de cultivo permitindo uma operação menos dispendiosa e custos de investimento mais baixos.

[0097] Os presentes inventores constataram que, em particular, compostos fenólicos como o composto fenólico presente no hidrolisado lignocelulósico seguindo como um processo do fracionamento do material lignocelulósico é particularmente útil como um inibidor microbiano no método da presente invenção. A vantagem de usar essa classe de inibidores é que a mesma é introduzida com o hidrolisado lignocelulósico e a concentração pode ser ajustada para ser incluída dentro da janela de tolerância do micróbio oleaginoso (primeiro micróbio) e fora da janela de tolerância do segundo micróbio (micróbio não oleaginoso) no caso de o último ser parcialmente tolerante ao inibidor microbiano.

[0098] O método da presente invenção, de preferência, usa micróbios oleaginosos que são altamente tolerantes a inibidores à base de lignocelulose, que fornece uma janela maior para ajustar o nível do inibidor microbiano no caldo de fermentação.

[0099] O inibidor inclui, mas não se limita a, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural, que estão presentes nas frações de hemicelulose e/ou celulose. A concentração pode ser ajustada para alcançar um nível em que o crescimento de micro-organismos contaminantes (micróbio não oleaginoso) é suprimido sem afetar ou pelo menos afetar significativamente o crescimento do micróbio oleaginoso. Além disso, visto que o método usa, de preferência, inibidores microbianos presentes no hidrolisado lignocelulósico, então, o hidrolisado não é submetido a uma etapa de remover os inibidores microbianos do hidrolisado. Dessa forma, em uma modalidade da presente invenção, o meio de cultivo que compreende um hidrolisado lignocelulósico fornecido na etapa (i) não foi submetido a um processo de desintoxicação para remover o dito pelo menos um inibidor de crescimento.

[00100] Em uma modalidade da presente invenção, o pelo menos um inibidor de crescimento microbiano é o grupo de composto fenólico, como o grupo total de compostos fenólicos presente no hidrolisado lignocelulósico (medidos como fenóis totais por volume, por exemplo, g/l). Em uma modalidade adicional, o nível dos ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação é pelo menos 1 g/l. A concentração pode ser alcançada ajustando-se a concentração do meio de cultivo para alcançar a concentração desejada no caldo de fermentação. Os compostos fenólicos são analisados com o método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002), que indica a quantidade total de compostos fenólicos em um líquido.

[00101] Em uma modalidade adicional, o nível dos ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação está na faixa de 1 g/l a 7 g/l ou acima (meio de crescimento). De acordo com uma modalidade da invenção, a concentração de compostos fenólicos no caldo de fermentação é entre 7 e 10 g/l, de acordo com outra modalidade, a concentração é entre 10 e 20 g/l e, de acordo com ainda outra modalidade, a concentração de compostos fenólicos é entre 20 e 50 g/l. Em ainda uma modalidade adicional, o nível de ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação está dentro da faixa de 1 g/l a 5 g/l, de preferência, dentro da faixa de 1 g/l a 3 g/l.

[00102] O teor do inibidor microbiano no hidrolisado lignocelulósico (frações de hemicelulose e celulose) e/ou no caldo de fermentação pode ser ajustado de várias maneiras para alcançar o nível desejado no caldo de fermentação.

[00103] A concentração de inibidor em fluxo de hemicelulose líquido pode ser ajustada alterando-se as condições (como temperatura, atraso (tempo de retenção), pH, teor de matéria seca), por exemplo, o fator de severidade, em etapa de processo de fracionamento de lignocelulose usada para liquefação de hemicelulose (pelo menos parcial),

como em tratamento hidrotérmico, auto-hidrólise e/ou explosão a vapor com ou sem a adição de ácidos. Alterando-se as condições em fracionamento de lignocelulose, os compostos inibitórios podem ser ajustados para resultar em um determinado nível de compostos inibitórios em fluxo líquido contendo hemicelulose.

[00104] Alternativamente, a concentração de inibidores microbianos em fluxo de açúcar hemicelulósico é ajustada por purificação do fluxo de hemicelulose por quaisquer métodos conhecidos, incluindo, mas não se limitando a, adsorção, absorção, filtração, esgotamento, calagem, evaporação, extração ou tratamento enzimático.

[00105] Tipicamente, o fluxo de açúcar contendo principalmente açúcares hemicelulósicos (fluxo rico em C5) derivados a partir da etapa de fracionamento de lignocelulose resultando em liquefação de hemicelulose (pelo menos parcialmente) contém quantidades maiores de compostos inibitórios, como compostos fenólicos, ácidos orgânicos (como ácido acético e ácido fórmico), furfural e/ou hidroximetilfurfural que o fluxo de açúcar (fluxo rico em C6) a partir de hidrólise enzimática de fração sólida contendo celulose e lignina.

[00106] A concentração de inibidor microbiano no fluxo de açúcar usado em cultivo pode ser ajustada misturando-se o fluxo de açúcar hemicelulósico (fluxo rico em C5) e fluxo de açúcar celulósico (fluxo rico em C6). A mistura do fluxo hemicelulósico e celulósico pode ser feita em qualquer proporção para alcançar a concentração apropriada de inibidores no cultivo que permite o crescimento de organismos produtores de óleo, porém previne ou significativamente inibe o crescimento de organismos contaminantes (não capazes de produção de óleo eficiente).

[00107] Os tratamentos para líquidos derivados de pré-tratamento com lignocelulose podem ser realizados para resultar também na concentração aumentada de inibidores ou aumento de concentração de

determinados inibidores e remoção de outros inibidores que podem ser vantajosos. Por exemplo, a evaporação de líquido de pré-tratamento contendo carboidratos hemicelulósicos pode resultar em concentração aumentada de inibidores não-voláteis (como compostos fenólicos) e concentração reduzida de inibidores voláteis como furfural, ácido acético e ácido fórmico. Dessa forma, parte dos compostos voláteis como furfural, pode ser removida durante a concentração de carboidratos.

[00108] Tipicamente, em produção de óleo unicelular são usados açúcares concentrados. Em concentração de fluxos de açúcar a partir de fracionamento de lignocelulose e hidrólise enzimática, tipicamente a evaporação é usada. A evaporação resulta na concentração de compostos não voláteis, por exemplo, compostos fenólicos, no concentrado de açúcar. De preferência, os organismos são usados em produção de óleo unicelular que toleram altas concentrações de compostos fenólicos.

[00109] De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, fluxos de açúcar a partir de fracionamento de lignocelulose contendo hemicelulose e celulose são concentrados antes de serem alimentados no processo de produção de óleo unicelular, porém nenhuma outra etapa de purificação é realizada. Dessa forma, a quantidade ideal de inibidores que permite o crescimento de micro-organismos oleaginosos, porém inibe o crescimento de micro-organismos não oleaginosos contaminantes é alcançada ajustando-se as condições em fracionamento de lignocelulose, por evaporação de fluxos de açúcar de lignocelulose e misturando-se o fluxo rico em açúcar de hemicelulose (xarope C5) e fluxo rico em açúcar de celulose (xarope C6) em caldo de fermentação.

[00110] O tratamento enzimático tem tempo de retenção longo (tipicamente 1 a 3 dia) e, dessa forma, é propenso à contaminação microbiana causando perda de açúcar e problemas em produção de óleo

microbiano (fermentação aeróbica). De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, a fração de celulose+lignina a partir da etapa de fracionamento que resulta em liquefação de hemicelulose pelo menos parcial é lavada somente a tal ponto que permita o tratamento enzimático, porém iniba o crescimento de micro-organismos contaminantes em hidrólise enzimática e, dessa forma, reduz as perdas de açúcar.

[00111] A quantidade de compostos inibitórios na fração sólida a partir de fracionamento de lignocelulose contendo celulose pode ser ajustada pela extensão de lavagem da fração sólida de celulose antes da hidrólise enzimática ou alterando-se as condições de processo (como temperatura, atraso (tempo de retenção), pH), em processo de fracionamento lignocelulósico que produz a fração sólida de celulose e lignina.

HIDROLISADO LIGNOCELULÓSICO USADO PELO MÉTODO DA INVENÇÃO

[00112] O hidrolisado lignocelulósico usado pelo método da presente invenção é um produto de hidrólise de lignocelulose ou material lignocelulósico. O hidrolisado de lignocelulose pode ser obtida por um ou mais tratamentos da lignocelulose ou material lignocelulósico incluindo hidrólise (tratamento hidrotérmico e/ou auto-hidrólise), explosão a vapor com ou sem a adição de ácidos, uma ou mais etapas de deslignificação, por exemplo, deslignificação usando um agente de deslignificação alcalina.

[00113] O hidrolisado de lignocelulose usado pelo método da invenção pode ser um produto de qualquer método de fracionamento de lignocelulose em que as hemiceluloses são pelo menos parcialmente dissolvidas.

[00114] Em uma modalidade, o hidrolisado de lignocelulose é obtido tratando-se a lignocelulose com auto-hidrólise como uma primeira eta-

pa. A auto-hidrólise é tipicamente executada em 5 a 40% de teor de matéria seca, a temperaturas entre 140 e 240 C durante 1 a 120 minutos sem a adição de compostos ácidos resultando em dissolução de 5 a 40% de teor de matéria seca em material lignocelulósico incluindo carboidratos hemicelulósicos. Tipicamente, a extração em água quente dissolve a partir de 30 a 100% de carboidratos hemicelulósicos de material lignocelulósico, de preferência, mais >50%, com mais preferência, >70%, com mais preferência, >80%, com mais preferência ainda, >90%. Os carboidratos de hemicelulose dissolvidos estão pelo menos parcialmente em forma oligomérica. Mais tipicamente, a auto-hidrólise é realizada em 10 a 30% de teor de matéria seca a 160 a 220 C, dependendo da matéria-prima lignocelulósica. Após a auto-hidrólise, as fases sólidas e líquidas são separadas por qualquer método, como filtração, por exemplo, filtração por pressão, ou por uma prensa de rosca. A fração sólida pode ser lavada para remover a hemicelulose dissolvida a partir de fase sólida.

[00115] De acordo com uma outra modalidade da invenção, o hidrolisado de lignocelulose é um produto de tratamento da lignocelulose com vapor ou explosão a vapor com ou sem a adição de compostos ácidos, em geral a temperaturas entre 110 e 250°C, mais tipicamente a temperaturas entre 140 e 230°C. O tratamento resulta em uma dissolução de carboidratos hemicelulósicos. Opcionalmente, o material sólido de explosão a vapor é lavado para recuperar os carboidratos hemicelulósicos dissolvidos.

[00116] De acordo com ainda outra modalidade da invenção, o hidrolisado de lignocelulose é um produto de tratamento da lignocelulose com amônio para dissolver carboidratos hemicelulósicos contendo oligômeros. De acordo com uma modalidade da invenção, a expansão de fibras de amônio (AFEX) ou percolação de reciclo de amônio é usada com uma temperatura entre 60 C e 220°C.

[00117] Durante o tratamento de material lignocelulósico, outros compostos orgânicos exceto carboidratos, como compostos fenólicos (como ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, vanilina, fenol, guaiacol, hidroquinona, catecol, ácido ferúlico, sirinгалdeído, ácido siríntrico), furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico são tipicamente formados e liberados em tratamento e dissolvidos em fase líquida juntamente com carboidratos hemicelulósicos. Ademais, extratos como ácido caproico, ácido caprílico, ácido palmítico e ácido pelargônico podem ser liberados.

[00118] Compostos fenólicos, furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e ácido fórmico são tipicamente inibitórios ao crescimento microbiano. As concentrações dos compostos que causam a inibição do crescimento são dependentes do micro-organismo. Alguns micro-organismos produtores de óleo, de preferência, fungos, com mais preferência, fungos filamentosos, são altamente tolerantes aos compostos inibitórios, como compostos fenólicos, furfural, HMF, ácido acético e ácido fórmico, formados em pré-tratamento de lignocelulose (isto é, hidrólise, fracionamento).

[00119] Conforme mencionado no presente documento, os inibidores microbianos gerados durante o fracionamento do material lignocelulósico para obter o hidrolisado de lignocelulose são particularmente úteis como inibidores microbianos no método da presente invenção.

[00120] A utilização de organismos de produção oleaginosos que são altamente tolerantes a esses compostos inibitórios é favorável desde que possa reduzir a necessidade e complexidade de operações unitárias para a remoção de inibidores e, além disso, reduzir ou prevenir o crescimento de micro-organismos contaminantes em processo de fermentação aeróbica em produção de óleo unicelular.

PRIMEIRO MICRÓBIO

[00121] Em uma etapa do método, o meio de cultivo que compreende um hidrolisato lignocelulósico é inoculado com um primeiro micróbio, que é um micróbio produtor de lipídeo (micróbio oleaginoso). Em uma modalidade da presente invenção, o primeiro micróbio (micróbio oleaginoso) é selecionado a partir da lista que consiste em fungos filamentosos, levedura, bactérias ou algas ou bactérias. De preferência, os organismos que são capazes de usar açúcares C6 e C5 são usados.

[00122] O micróbio oleaginoso pode produzir lipídeo naturalmente ou o micróbio oleaginoso pode ser obtido por modificação genética, que aumenta a produção de lipídeo intracelular e a capacidade de o micróbio acumular lipídeos intracelulares.

[00123] No contexto da presente invenção, o primeiro micróbio (o micróbio oleaginoso) se refere a um micro-organismo que tem a capacidade de acumular lipídeos intercelulares de modo que os lipídeos equivalham a pelo menos 15% (p/p) da biomassa total (por peso seco de célula) do micróbio quando o mesmo é cultivado sob condições adequadas. Dessa forma, em uma modalidade da presente invenção, o dito primeiro micróbio (micróbio oleaginoso) é capaz de produzir e acumular mais de 15% de seu peso como lipídeo (por peso seco de célula). Em uma modalidade preferencial, o primeiro micróbio (micróbio oleaginoso) é capaz de acumular pelo menos 20% (p/p) da biomassa total do micróbio (por peso seco de célula).

[00124] Por conseguinte, os micróbios que não estão dentro da definição acima em relação à sua capacidade de acumular lipídeos intercelulares são considerados como micróbio não oleaginoso e, portanto, indesejados durante a incubação. No contexto da presente invenção, o segundo micróbio se refere a um micróbio não oleaginoso, isto é, a capacidade de o segundo micróbio acumular lipídeos intercelulares

está abaixo de 15% (p/p) da biomassa total (por peso seco de célula) quando o mesmo é cultivado sob condições adequadas.

[00125] Em uma modalidade da presente invenção, o primeiro micróbio (micróbio oleaginoso) é selecionado do grupo consistindo em *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium* e *Cryptococcus*. Os inventores constataram que as espécies desses gêneros são particularmente tolerantes a inibidor microbiano presente no hidrolisado lignocelulósico, como os compostos fenólicos discutidos no presente documento.

[00126] Micróbios não oleaginosos (segundo micróbio) incluem bactérias não oleaginosas incluindo, mas não se limitando a *Bacillus spp.* E *Pseudomonas spp.* Dessa forma, em uma modalidade da presente invenção, o segundo micróbio é selecionado do grupo consistindo em *Bacillus spp* como *Bacillus subtilis.*, *Pseudomonas spp.* como *Pseudomonas fluorescens*. Os inventores constataram que esses micróbios não oleaginosos são intolerantes a inibidores microbianos presentes em hidrolisado lignocelulósico, em particular, os compostos fenólicos do hidrolisado lignocelulósico.

[00127] De acordo com uma outra modalidade da invenção, o segundo micróbio não oleaginoso é leveduras não oleaginosas selecionadas a partir de leveduras não oleaginosas, fungos filamentosos não oleaginosos ou microalgas não oleaginosas.

[00128] Por conseguinte, quando o segundo micróbio (micróbios não oleaginosos) é intolerante a inibidores microbianos sob a forma de compostos fenólicos do hidrolisado lignocelulósico, então, os micróbios oleaginosos (primeiro micróbio) são, de preferência, selecionados a partir dos micróbios oleaginosos, que são particularmente tolerantes aos compostos fenólicos presentes no hidrolisado lignocelulósico.

[00129] Dessa forma, em uma modalidade da presente invenção, o primeiro micróbio (micróbio oleaginoso) é selecionado do grupo con-

sistindo em *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium* e *Cryptococcus* e o pelo menos um inibidor de crescimento microbiano é o grupo de composto fenólico, como o grupo total de compostos fenólicos presentes no hidrolisado lignocelulósico (medido como concentração de fenol total por volume de caldo de fermentação, por exemplo, como WI) e, de preferência, o nível de ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação é pelo menos 1 g/l, como dentro da faixa de 1 g/l a 7 g/l ou acima (meio de crescimento). Em ainda uma modalidade adicional, o nível de ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação está dentro da faixa de 1 g/l a 5 g/l, de preferência, dentro da faixa de 1 g/l a 3 g/l. De acordo com uma modalidade da invenção, a concentração de compostos fenólicos no caldo de fermentação é entre 7 e 10 WI, de acordo com uma outra modalidade, a concentração é entre 10 e 20 WI, e de acordo com ainda outra modalidade, a concentração de compostos fenólicos é entre 20 e 50 g/l.

CALDO DE FERMENTAÇÃO E USO DO MESMO

[00130] Um segundo aspecto da presente invenção refere-se a um caldo de fermentação que compreende um hidrolisado lignocelulósico, pelo menos um inibidor de crescimento microbiano e um micróbio oleaginoso, em que o dito micróbio oleaginoso é tolerante ao(s) dito(s) inibidor(es) de crescimento microbiano.

[00131] De preferência, o dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano está presente no hidrolisado lignocelulósico como um composto gerado pelo pré-tratamento por fracionamento do material lignocelulósico para obter o hidrolisado lignocelulósico.

[00132] O teor do inibidor microbiano no hidrolisado lignocelulósico (frações de hemicelulose e celulose) e/ou no caldo de fermentação pode ser, dessa forma, ajustado para alcançar o nível desejado no caldo de fermentação. De preferência, o pelo menos um inibidor microbiano consiste nos compostos fenólicos do hidrolisado lignoceluló-

sico e o micróbio oleaginoso é um micróbio oleaginoso tolerante aos compostos fenólicos presentes no hidrolisado lignocelulósico

[00133] Outro aspecto se refere ao uso do caldo de fermentação da presente invenção em um método para produzir um lipídeo microbiano.

[00134] Ainda outro aspecto se refere ao uso de uma composição que compreende pelo menos um inibidor de crescimento microbiano em um método para produzir um lipídeo, em que o lipídeo é produzido e se acumula em um micróbio oleaginoso e em que o dito micróbio oleaginoso é tolerante ao dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano. Em uma modalidade preferencial, a composição de hidrolisado lignocelulósico e o pelo menos um inibidor microbiano consiste nos compostos fenólicos presentes no hidrolisado lignocelulósico aos quais o dito micróbio oleaginoso é tolerante.

[00135] Em uma modalidade preferencial da invenção, o cultivo para produção de óleo microbiano em hidrolisados lignocelulósicos é realizada em condições não estéreis. De acordo com uma outra modalidade preferencial da invenção, o caldo de cultivo (também chamado de caldo de fermentação) contendo hidrolisado lignocelulósico é tratado por calor, porém não esterilizado, como pasteurizado e usado em processo de produção de óleo unicelular. De acordo com uma outra modalidade preferencial da invenção, o tratamento térmico de caldo contendo hidrolisado lignocelulósico é uma etapa de evaporação usada para concentrar açúcares em hidrolisados lignocelulósicos. O tratamento térmico combinado (por exemplo, pasteurização e/ou evaporação) juntamente com compostos inibitórios derivados de lignocelulose permitem o cultivo não asséptico em produção de óleo unicelular.

[00136] Quando se descrevem as modalidades da presente invenção, as combinações e permutações de todas as modalidades possíveis não foram explicitamente descritas. Entretanto, o simples fato de

determinadas medidas serem citadas em reivindicações dependentes mutuamente diferentes ou descritas em modalidades diferentes não indica que uma combinação dessas medidas não pode ser usada com vantagem. A presente invenção contempla todas as combinações e permutações possíveis das modalidades descritas.

[00137] O termo "compreendendo", "compreendem" e "compreende" no presente documento são destinados pelo requerente a serem opcionalmente substituídos pelos termos "consistindo em", "consistem em" ou "consiste em", respectivamente, em cada caso.

ITENS

[00138] A seguir, a invenção é descrita por itens não limitadores.

[00139] Item 1. Um método para produzir lipídeos, que compreende as seguintes etapas

(i) fornecer um meio de cultivo compreendendo um hidrolisado lignocelulósico,

(ii) fornecer um caldo de fermentação inoculando-se o meio de cultivo de (i) com um primeiro micróbio, em que o dito primeiro micróbio é um micróbio oleaginoso,

(iii) incubar o dito meio inoculado com o dito primeiro micróbio permitindo que os lipídeos se acumulem,

em que o dito caldo de fermentação compreende pelo menos um inibidor de crescimento microbiano e em que o dito primeiro micróbio é tolerante ao(s) dito(s) inibidor(es) de crescimento microbiano, em que a dita incubação é conduzida sob condições aeróbicas.

[00140] Item 2. O método de item 1 compreende adicionalmente uma etapa de recuperar o lipídeo acumulado a partir do dito primeiro micróbio.

[00141] Item 3. O método de item 1 ou 2, em que o dito caldo de fermentação compreende adicionalmente um segundo micróbio, que é intolerante ao dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano.

[00142] Item 4. O método de acordo com o item 3, em que o dito segundo micróbio está presente no meio de cultivo fornecido na etapa (i) ou contaminou o caldo de fermentação na etapa (ii) ou (iii).

[00143] Item 5. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o dito segundo micróbio é um micróbio não oleaginoso.

[00144] Item 6. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano está presente no meio de cultivo fornecido na etapa (i).

[00145] Item 7. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano está presente no dito caldo de fermentação em uma concentração dentro da faixa de tolerância do dito primeiro micróbio e fora da faixa de tolerância do dito segundo micróbio.

[00146] Item 8. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, que compreende adicionalmente uma etapa de adicionar o dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano ou ajustar a concentração de dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano no caldo de fermentação.

[00147] Item 9. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que pelo menos um inibidor de crescimento microbiano é o grupo de compostos fenólicos (medido como a concentração de fenóis totais por volume de caldo de fermentação).

[00148] Item 10. O método de acordo com o item 9, em que o nível dos ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação é pelo menos 1 g/l.

[00149] Item 11. O método de acordo com o item 9 ou 10, em que o nível dos ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação está na faixa de 1 g/l a 7 g/l ou acima (meio de crescimento).

[00150] Item 12. O método de acordo com qualquer item 9 a 11, em

que o nível de ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação está dentro da faixa de 1 g/l a 5 g/l, de preferência, dentro da faixa de 1 g/l a 3 g/l.

[00151] Item 13. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o dito primeiro micróbio é selecionado a partir da lista que consiste em fungos filamentosos, levedura, bactérias e algas.

[00152] Item 14. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o dito primeiro micróbio é selecionado do grupo consistindo em *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium* e *Cryptococcus*.

[00153] Item 15. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o dito segundo micróbio é não oleaginoso selecionado a partir da lista que consiste em bactérias, levedura, fungos filamentosos ou microalgas.

[00154] Item 16. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o dito segundo micróbio é uma bactéria selecionada do grupo que consiste em *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.

[00155] Item 16. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o meio de cultivo que compreende hidrolisado lignocelulósico fornecido na etapa (i) não foi esterilizado.

[00156] Item 17. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o meio de cultivo que compreende um hidrolisado lignocelulósico fornecido na etapa (i) não foi submetido a um processo de desintoxicação para remover o dito pelo menos um inibidor de crescimento.

[00157] Item 18. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o método não é realizado sob condições assépticas.

[00158] Item 19. O método de acordo com qualquer um dos itens anteriores, em que o dito primeiro micróbio é capaz de produzir e

acumular mais de quinze por cento de seu peso como lipídeo (por peso seco de célula).

[00159] Item 20. Um caldo de fermentação que compreende um hidrolisado lignocelulósico, pelo menos um inibidor de crescimento microbiano e um micróbio oleaginoso, em que o dito micróbio oleaginoso é tolerante ao(s) dito(s) inibidor(es) de crescimento microbiano.

[00160] Item 21. Uso do caldo de fermentação de item 20 em um método para produzir um lipídeo.

[00161] Item 22. Uso de uma composição que compreende pelo menos um inibidor de crescimento microbiano em um método para produzir um lipídeo, em que o lipídeo é produzido e se acumula em um micróbio oleaginoso e em que o dito micróbio oleaginoso é tolerante ao dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano.

EXEMPLOS

PREPARAÇÃO DE HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS PARA CULTIVOS

LÍQUIDO DE AUTO-HIDRÓLISE A

[00162] O líquido de auto-hidrólise A foi preparado submetendo-se a palha de trigo ao tratamento de auto-hidrólise a 195°C seguido de explosão a vapor à temperatura e pressão ambientes. Após a auto-hidrólise, o material foi suspenso em água da torneira para separar açúcares hemicelulósicos dissolventes. A separação sólido-líquido foi realizada por filtração por pressão até a fase líquida de formação de suspensão contendo hemicelulose e, uma fase sólida contendo celulose e lignina. A fase líquida (contendo açúcares hemicelulósicos parcialmente em forma oligomérica) foi concentrada para obter o líquido de auto-hidrólise A usado no cultivo. O líquido de auto-hidrólise A continha 112 g/L de açúcares com base na análise por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e 13 g/L de compostos fenólicos com base na análise com o método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002).

[00163] No experimento de cultivo, o hidrolisado foi diluído em água para obter a concentração desejada do caldo de cultivo.

LÍQUIDO DE AUTO-HIDRÓLISE B

[00164] O líquido de auto-hidrólise B foi preparado a partir de palha de trigo com um tratamento que consiste em lavar a palha seguido de auto-hidrólise. Primeiro, a palha de trigo (38,1 kg DM) foi lavada em um reator de tanque agitado de 500 dm³ com água a 80°C. A primeira fração sólida foi separada da primeira fração líquida em um filtro Seitz. A primeira fração sólida (34,7 kg DM) foi manualmente carregada em um reator de 500 dm³ e misturada com água para render a suspensão em 8,6% de consistência. A suspensão foi aquecida a 175°C (9,8 bar), e a pressão foi liberada abrindo-se a válvula conectada ao reator. A segunda fração líquida foi separada da segunda fração sólida em uma centrífuga decantadora. A segunda fração sólida foi lavada em suspensão uma vez com água e a terceira fração líquida foi separada da fração sólida lavada (128 kg tendo 16,9% de teor de matéria seca) foi obtida. A segunda e a terceira frações líquidas foram combinadas, passadas através de filtro de manga e o filtrado obtido (514 kg) foi tratado com carvão ativado (4,1 kg) à temperatura ambiente. O líquido tratado com carvão ativado foi clarificado e concentrado em um evaporador de filme descendente para render 23,8 kg de líquido de auto-hidrólise concentrado tendo 16,3% de teor de matéria seca e substância seca refratométrica 18°Bx. O líquido de auto-hidrólise concentrado foi novamente concentrado por evaporação para render o líquido de auto-hidrólise B tendo pH 4,8 e 44,6% de teor de matéria seca cujo teor de carboidratos total compreende 78,1% (p/p). O teor de carboidratos foi determinado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) após hidrólise ácida diluída (4% de p/p de ácido sulfúrico, 121°C, 1 h) da amostra. A concentração de compostos fenólicos era 31g/L com base na análise com o método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002).

[00165] Após isso, o líquido de auto-hidrólise (contendo açúcares hemicelulósicos parcialmente em forma oligomérica) foi usado em experimentos de cultivo como tal.

LÍQUIDO DE AUTO-HIDRÓLISE C

[00166] A reação de auto-hidrólise de palha de trigo e isolamento subsequente de oligossacarídeos de hemicelulose foi realizada para produzir uma fração líquida para fermentação, e a fração sólida suscetível para hidrólise enzimática. Para obter isso, 35,7 kg de palha de trigo (89,8% de teor de matéria seca) foram misturados com 240 kg de água gerando a suspensão em 11,6% de consistência em um reator com tanque de agitação de 500 dm³. A suspensão foi aquecida a 180°C seguido de resfriamento abaixo de 100°C. A suspensão hidrotermicamente tratada foi descarregada do reator e a primeira fração líquida separada da fração sólida usando uma centrífuga decantadora. A fração sólida foi lavada em suspensão em água ácida ajustada para pH 4 com ácido fosfórico. A fração sólida foi separada da segunda fração líquida na centrífuga decantadora. As primeira e a segunda frações líquidas foram combinadas e concentradas em um evaporador de filme descendente para render 18,3 kg de líquido de auto-hidrólise formando o líquido de auto-hidrólise C contendo açúcares de hemicelulose parcialmente em forma oligomérica e tendo 42% de teor de matéria seca e substância seca refratométrica 38°Bx. A fração sólida lavada (96,7 kg tendo 23,0% de teor de matéria seca) foi usada como material de alimentação para hidrólise enzimática de modo a produzir hidrolisado de celulose para cultivo.

[00167] Parte dos compostos fenólicos do concentrado líquido de auto-hidrólise contida foi removida tratando-se o líquido adicionando-se 40 g/l de carvão ativado, misturando-se gentilmente durante 20 horas em 4 C e, por fim, remoção por filtração de carbono usando pano de filtração de 400 um. Esse líquido foi usado no exemplo 3 (líquido de

auto-hidrólise purificado C). No exemplo 4, o hidrolisado foi usado como tal, sem purificação.

[00168] O hidrolisado enzimático de fração de celulose de palha de trigo foi preparado da fração sólida contendo celulose (após a lavagem) a partir de experimento de auto-hidrólise em que o líquido de auto-hidrólise C foi preparado. A fração sólida lavada de tratamento de auto-hidrólise que forma o líquido de auto-hidrólise C (17,3 kg tendo 23,1% de teor de matéria seca) foi pesada em um reator com tanque de agitação de 40 dm³ e misturada com 14,7 kg de água e 10 mL 50% de NaOH (p/p) para render a suspensão em 12,5% de consistência e em pH 5. O reator foi aquecido e mantido a 50°C e 216 ml de mistura enzimática compreendendo 82% de celulose (Econase CE, Roal Oy), 10% de celobiase (Novozyme 188, Sigma/Novozymes) e 7% de xilanaase (GC140, Genencor). Durante o tratamento enzimático, a suspensão foi agitada periodicamente três vezes por hora durante 5 minutos. Após 48 h de tempo de residência, a suspensão foi suplementada com mistura enzimática fresca que equivale a 10% da dosagem de enzima inicial e tendo proporções similares de enzimas individuais. Após 72 horas de tempo de residência a 50°C, a fração líquida foi separada da fração sólida usando uma prensa hidráulica. A fração sólida foi lavada uma vez com água e a fração líquida novamente separada da fração sólida. As frações líquidas foram combinadas e concentradas por evaporação sob pressão reduzida. O concentrado de hidrolisado celulósico (1,57 kg) continha 220 g/l de açúcar total.

[00169] O hidrolisado de celulose contendo açúcares monoméricos foi usado como tal no cultivo.

LÍQUIDO DE AUTO-HIDRÓLISE D

[00170] Uma suspensão foi preparada misturando-se 10,5 kg de palha de trigo moída (92,7% de teor de matéria seca) e 54,1 kg de água da torneira em um recipiente de 100 dm³. Após armazenamento

à temperatura ambiente durante 18 h, 64,2 kg da suspensão foram pesados em um reator de autoclave com agitação cilíndrico de 250 dm³. O reator foi fechado e aquecido dentro de 75 min a 140°C, mantido a 140°C durante 5 h e resfriado até a temperatura ambiente dentro de 30 minutos. A suspensão hidrotermicamente tratada foi manualmente descarregada do reator, e a primeira fração líquida foi separada do primeiro sólido por filtração. A primeira fração sólida foi lavada duas vezes com água da torneira e prensada usando uma prensa hidráulica gerando uma fração sólida lavada. A fração sólida lavada (20,9 kg) tinha 42,7% de teor de matéria seca. A primeira fração líquida foi combinada com água de lavagem e concentrada em um evaporador de filme descendente a 11,5% (p/p) de teor de matéria seca. O líquido concentrado, líquido de auto-hidrólise D, continha 49,3% de açúcar total da matéria seca total do líquido concentrado como determinado após hidrólise ácida diluída (4% p/p de ácido sulfúrico, 121°C, 1 h) por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). As proporções relativas de xilose anidra, arabinose anidra, glicose anidra, e galactose anidra do teor de açúcar total eram 57%, 19%, 13%, e 11%, respectivamente.

[00171] Após isso, o líquido de auto-hidrólise D contendo açúcares hemicelulósicos parcialmente em forma oligomérica foi usado em experimentos de cultivo como tal.

EXEMPLO 1 - O EFEITO DE ÁCIDO ACÉTICO E ÁCIDO FÓRMICO SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO

[00172] Os experimentos foram feitos usando um lipídeo que produz a cepa fúngica *Aspergillus.oryzae*. A partir da esporulação de fungos desenvolvidos em placas PDA, uma suspensão de esporo foi feita adicionando-se 12 ml de água estéril e os esporos foram removidos por raspagem com uma alça de inoculação ao líquido. A suspensão de esporo foi usada para inoculação de meio.

[00173] Os componentes de base de meio são apresentados na tabela 1 1. Todos contiham esses nutrientes básicos e uma pequena quantidade de celulose fina para impedir que o fungo se aglutine.

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DE MEIO BÁSICO

	g/l
Celulose	2
extrato de malte	30
Peptona	3

[00174] O meio foi feito usando água da torneira.

[00175] Os ácidos orgânicos foram adicionados, então, a concentração do ácido fórmico e acético individualmente era 0, 1, 3, 5 e 7 g/l, e para os dois ácidos em conjunto 0, 1, 3, 5, 7 e 9 g/l. Após isso, o pH do meio foi ajustado para 5,5 a 6,0 usando 3 M de NaOH. O meio foi distribuído em lotes de 50 ml em frascos erlenmayer de 250 ml. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 C por 15 min. Após o resfriamento, cada frasco foi inoculado usando 0,5 ml de suspensão de esporo mencionada anteriormente. Para cada concentração, cultivos paralelos foram feitos. Os cultivos foram incubados em 160 rpm de agitação a 28°C por 5 dias. O crescimento foi observado diariamente com um microscópio, e no final do cultivo, os teores de biomassa e lipídeo foram determinados.

[00176] O teor de biomassa foi determinado por filtração a vácuo do conteúdo total do frasco e lavagem da biomassa com 50 ml de água destilada. Após isso, as tortas de biomassa foram congeladas e secas de um dia para o outro em liofilizador. A partir da biomassa seca, o teor de lipídeos foi analisado de acordo com Suutari et al. (1990). Os lipídeos nas amostras foram, primeiro, hidrolisados em ácidos gra-

xos livres, que foram saponificados em sais de sódio dos mesmos e, então, metilados em metil ésteres. Os metil ésteres graxos foram analisados por cromatógrafo a gás.

[00177] Resultados: Em todos os frascos independentemente de concentração de ácido, o crescimento começou quase ao mesmo tempo. As concentrações de biomassa e lipídeo também eram muito similares. Com base nesses resultados, pode-se afirmar que os ácidos testados, separados ou em conjunto, não tiveram efeito sobre o crescimento de fungos ou produção de lipídeos. As concentrações de biomassa e lipídeo são apresentadas na tabela 2.

TABELA 2: CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA E TEORES DE LIPÍDEOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO.

Concentração de ácido acético g/l	Concentração de biomassa g/l	Teor de lipídeos (% de peso seco de célula)
0	12,4	20,1
1	12,4	19,8
3	11,4	20,7
5	11,1	21,2
7	11,5	24,3

Concentração de ácido fórmico (g/l)	Concentração de biomassa g/l	Teor de lipídeos (% de peso seco de célula)
0	12,9	18,9
1	12,5	19,5
3	12,0	19,5
5	11,2	15,9
7	10,9	19,8

Concentração tanto de ácido acético como fórmico (g/l)	Concentração de biomassa g/l	Teor de lipídeos (% de peso seco de célula)
0	12,9	18,9
1	12,4	20,3
3	11,6	18,1
5	11,0	22,0
7	10,4	17,4
9	9,5	15,9

EXEMPLO 2 - O EFEITO DE INIBIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

[00178] Os experimentos foram feitos usando produção de cepas

de fungos e levedura *Aspergillusoryzae*, *Mortierella. isabellina* e *Li-pomyces starkeyi*. Dois hidrolisados lignocelulósicos diferentes de tratamento de auto-hidrólise de lignocelulose contendo açúcares hemice-lulósicos e quantidades notáveis de fenólicos foram testados, o líquido de auto-hidrólise A e o líquido de auto-hidrólise B. Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com o método de Folin-Ciocalteu com ácido gálico como padrão (Waterhouse, 2002).

[00179] A partir da esporulação de fungos desenvolvidos em placas PDA, uma suspensão de esporo foi feita adicionando-se 12 ml de água estéril e os esporos foram removidos por raspagem com uma alça de inoculação ao líquido. A suspensão de esporo foi usada para inoculação de meio.

[00180] Os componentes de base de meio são apresentados na tabela 3 1. Todos continham esses nutrientes básicos e uma pequena quantidade de celulose fina para impedir que o fungo se aglutine.

TABELA 3: COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CRESCIMENTO

	g/l
glicose	20
extrato de malte	30
peptona	3

[00181] O meio foi feito usando água da torneira.

[00182] O líquido de auto-hidrólise A ou B foi adicionado de modo que a concentração de fenólicos fosse 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 g/l. Após isso, o pH do meio foi ajustado para 6,5 usando 3 M de NaOH. O meio foi distribuído em lotes de 50 ml em frascos erlenmayer de 250 ml. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 C por 15 min. Após o resfriamento, cada frasco foi inoculado usando 0,5 ml de suspensão de es-

poro mencionada anteriormente no caso de fungos, e com a levedura, uma suspensão de levedura pré-cultivada foi usada. Para cada concentração, cultivos paralelos foram feitos. Os cultivos de fungos foram incubados em agitação em 160 rpm, e as leveduras em 160 rpm, todos a 28 C por 5 dias. O crescimento foi observado duas vezes ao dia com um microscópio, e no final do cultivo os teores de biomassa foram determinados.

[00183] O teor de biomassa fúngica foi determinado por filtragem a vácuo do conteúdo total do frasco e lavagem da biomassa com 50 ml de água destilada. Após isso, as tortas de biomassa foram congeladas e secas de um dia para o outro no liofilizador e o teor de biomassa foi determinado.

[00184] O teor de biomassa de levedura foi determinado medindo-se tubos pré-pesados de 7 ml de suspensão de crescimento de teste, amostras paralelas de cada frasco. As amostras foram centrifugadas em 6000 rpm por 10 minutos, após isso, o sobrenadante foi removido, 7 ml de água destilada foram adicionadas, o conteúdo de tubo foi bem misturado e a centrifugação repetida. A água de lavagem foi, então, removida e tanto péletes de biomassa como os sobrenadantes foram congelados. Depois, as amostras de biomassa foram liofilizadas e o teor de biomassa foi determinado.

RESULTADOS:

[00185] Por observações microscópicas, poderia ser observado que quando a concentração de fenólicos aumentou, o tempo necessário para o crescimento começar aumentou um pouco mais com alguns micróbios. Os cultivos foram monitorados duas vezes ao dia, então, a determinação do momento exato que o crescimento começou não é possível, porém estimativas aproximadas podem ser feitas. Com a levedura *L. starkeyi* e o fungo *A. oryzae*, não houve atraso notável em qualquer uma das concentrações de fenólicos testadas e todos se de-

envolveram após um dia de incubação. Por outro lado, o crescimento de fungo *M. isabellina* começou mais lentamente quando a concentração de fenólicos aumentou acima de 4 g/l.

[00186] *A. oryzae* poderia se desenvolver mesmo na concentração de fenólicos mais alta testada: 7 g/l, porém o teor de biomassa estava diminuindo quando a concentração de fenólicos aumentou mais. *L. starkeyi* e *M. isabellina* poderiam se desenvolver até uma concentração de 6 g/l, em 7 g/l nenhum crescimento foi detectado. Similar a *A. oryzae*, o teor de biomassa estava diminuindo quando a concentração de fenólicos aumentou mais. Nenhuma diferença entre hidrolisados diferentes de inibição de auto-hidrólise foi detectada. Na tabela a seguir, o teor de biomassa dos micróbios testados em várias concentrações de fenólicos é fornecido.

TABELA 4: TEOR DE BIOMASSA PARA OS MICRÓBIOS TESTADOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS.

Micróbio	Líquido de auto-hidrólise	Concentração de Compostos Fenólicos (g/l)	Concentração de Biomassa (g/l)
<i>Mortierella isabellina</i>	A	0	12,4
<i>Mortierella isabellina</i>	A	1	10,7
<i>Mortierella isabellina</i>	A	2	10,4
<i>Mortierella isabellina</i>	A	3	7,4
<i>Mortierella isabellina</i>	A	4	5,1
<i>Mortierella isabellina</i>	A	5	1,5
<i>Mortierella isabellina</i>	A	6	0
<i>Mortierella isabellina</i>	A	7	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	0	15,0

Micróbio	Líquido de auto-hidrólise	Concentração de Compostos Fenólicos (g/l)	Concentração de Biomassa (g/l)
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	1	15,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	2	13,2
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	3	11,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	4	11,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	5	11,2
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	6	11,1
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	7	7,6
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	0	14,7
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	2	13,8
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	3	10,1
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	4	8,5
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	5	3,7
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	6	0,6
<i>Mortierella isabellina</i>	B	0	12,54
<i>Mortierella isabellina</i>	B	2	7,7709
<i>Mortierella isabellina</i>	B	3	6,4339
<i>Mortierella isabellina</i>	B	4	4,9039
<i>Mortierella isabellina</i>	B	5	3,8129
<i>Mortierella isabellina</i>	B	6	0,6259
<i>Mortierella isabellina</i>	B	7	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	0	14,9

Micróbio	Líquido de auto-hidrólise	Concentração de Compostos Fenólicos (g/l)	Concentração de Biomassa (g/l)
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	3	9,5
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	4	8,0
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	5	6,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	6	6,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	B	7	5,3
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	0	14,7
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	2	10,4
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	4	6,5
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	5	5,6
<i>Lipomyces starkeyi</i>	B	6	3,3

EXEMPLO 3 - CRESCIMENTO FÚNGICO E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM AÇÚCARES DE HIDROLISADO DE HEMICELULOSE E CELULOSE DE PALHA DE TRIGO

[00187] Os experimentos foram feitos usando um lipídeo que produz a cepa fúngica *A.oryzae*. A partir da esporulação de fungos desenvolvidos em placas PDA, uma suspensão de esporo foi feita adicionando-se 12 ml de água estéril e os esporos foram removidos por raspagem com uma alça de inoculação ao líquido. 24 ml da suspensão de esporo foram diretamente usados para inoculação de fermentador. A composição de meio é apresentada na tabela 5. O líquido de auto-hidrólise purificado C (solução de hemicelulose) e o hidrolisado de celulose do mesmo experimento foram usados no cultivo. O cultivo foi

feito em fermentador Biostat B plus 5 l em 3 l de volume, e enquanto isso a agitação foi ajustada para 500 rpm, o pH foi mantido em 5,5 com 3 M de NaOH, a aeração foi 1 vvm e a temperatura a 35 C durante o crescimento, em produção de lipídeo foi reduzida para 28 C.

TABELA 5: COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CRESCIMENTO

Componentes de meio	Concentração (g/l)
Açúcares hemicelulósicos	20
Extrato de levedura	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
MgCl * 6 H ₂ O	1,5
K ₂ HPO ₄	0,8
KH ₂ PO ₄	1,5
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,3

[00188] Após a inoculação, demorou cerca de 30 h até o fundo começar a crescer ativamente. Durante o cultivo, a solução de hemicelulose foi adicionada em pequenos lotes, e após 95 horas de cultivo, as alimentações foram alteradas para o hidrolisado celulósico. Durante o cultivo, no total 236 g de hidrolisado de hemicelulose e 484 g de celulose foram adicionados. Parte dos açúcares adicionados foi deixada inutilizada no final da fermentação. Em 167 h, quando o cultivo terminou, havia 16 g/l de biomassa, desses, 43% de lipídeos (Figura 1). Poderia ser concluído que a produção de óleo microbiano a partir de açúcares de hemicelulose e celulose de palha de milho foi bem-sucedida. No início da fermentação, a concentração de fenólicos era 4 g/l, e no final, 6 g/l (um cálculo baseado em quantidade original de hemicelulose). Portanto, também pode-se afirmar que o crescimento

fúngico e a produção de lipídeo eficiente foram realizados apesar de altas concentrações de inibidores.

EXEMPLO 4 - O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES EM COMPOSTOS FENÓLICOS CONTENDO SOLUÇÃO HEMICELULÓSICA

[00189] Os experimentos foram feitos com as bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*. Os componentes de base de meio são apresentados na tabela 6 1. Todos continham esses nutrientes básicos e compostos fenólicos contendo solução de hemicelulose de modo que a concentração final de compostos fenólicos fosse 0, 1, 2 e 3 g/l.

[00190] O líquido de auto-hidrólise C (solução de hemicelulose) foi usado no cultivo e o mesmo continha 160 g/l de açúcares com base na análise por HPLC, DW 460 g/l e 33 g/l de compostos fenólicos em análise com o método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002).

TABELA 6: COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CRESCIMENTO

	g/l
glicose	20
extrato de malte	30
peptona	3

[00191] O meio foi feito usando água da torneira.

[00192] O líquido de auto-hidrólise C (solução de hemicelulose) foi adicionado de modo que a concentração de compostos fenólicos fosse 0, 1, 2 e 3 g/l. Após isso, o pH do meio foi ajustado para 6,5 usando 3 M de NaOH. O meio foi distribuído em lotes de 50 ml em frascos erlenmayer de 250 ml. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 C por 15 minutos. Após o resfriamento, cada frasco foi inoculado usando 0,5

ml de suspensão de bactérias pré-cultivadas. Para cada concentração, cultivos paralelos foram feitos. Os cultivos foram incubados em agitação em 250 rpm, a 28 C por 5 dias. O crescimento foi observado diariamente com um microscópio e no final do cultivo, os teores foram determinados. As amostras de concentração de açúcar foram feitas centrifugando-se a biomassa, diluindo-se o sobrenadante por 10 com água destilada e a análise por HPLC foi feita.

RESULTADOS:

[00193] Com base nas observações de microscópio, poderia ser observado que ambas as bactérias se desenvolveram apenas naqueles frascos que não continham compostos fenólicos. No final do cultivo, somente nos frascos que não continham compostos fenólicos todos os açúcares foram consumidos. Em frascos que continham compostos fenólicos, a mesma quantidade de açúcares tal como no início estava presente. Poderia ser concluído que mesmo em pequenas concentrações os compostos fenólicos inibem de modo eficiente o crescimento de muitas bactérias contaminantes. Poderia ser concluído que o crescimento de bactérias contaminantes pode ser inibido ou prevenido usando hidrolisados lignocelulósicos contendo compostos inibitórios, como compostos fenólicos, compostos em concentrações que não inibem significativamente o crescimento de levedura oleaginosa e fungos filamentosos (exemplos 2, 3 e 6).

EXEMPLO 5 - CONTROLAR AS CONTAMINAÇÕES COM O AUXÍLIO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E TRATAMENTO TÉRMICO RÁPIDO

[00194] Os experimentos foram feitos usando um lipídeo que produz a cepa fúngica *A.oryzae*. A partir da esporulação de fungos desenvolvidos em placas PDA, uma suspensão de esporo foi feita adicionando-se 12 ml de água estéril e os esporos foram removidos por raspagem com uma alça de inoculação ao líquido. 0,5 ml da suspen-

são de esporo foi usado para cada inoculação em frasco. A composição de meio é apresentada na tabela 9.

[00195] Os compostos fenólicos contendo líquido de auto-hidrólise, o líquido de auto-hidrólise A (solução de hemicelulose), foram adicionados de modo que a concentração final no meio fosse 3,5 g/l. Após isso, o pH do meio foi ajustado para 6,5 usando 3 M de NaOH. O meio foi distribuído em lotes de 50 ml em frascos erlenmayer de 250 ml. O extrato de levedura, no presente documento, foi usado como uma fonte para micróbios contaminantes.

TABELA 9: COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CRESCIMENTO

	g/l
Glicose	40
Compostos Fenólicos	3,5
Extrato de levedura	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

[00196] Metade do meio preparado dessa maneira foi rapidamente aquecida a 80 C e, e, então, resfriada. Para o restante do meio, nenhum tratamento térmico foi feito. Metade de cada um dos frascos diferentemente tratados foi inoculada com 0,5 ml de suspensão de esporo de *A. oryzae*. A outra metade dos frascos foi deixada não inoculada. Também, dois frascos de meio descritos acima sem adição de compostos fenólicos foram feitos. Os mesmos foram tratados com calor a 80 C e inoculados como outros cultivos. Todos os cultivos foram incu-

bados a 28 C e agitação em 160 rpm por 7 dias. O crescimento microbiano foi verificado diariamente com microscópio.

RESULTADOS:

[00197] Após 1 dia de incubação foi observado que o fungo se desenvolveu em todos os meios que foi inoculado com a suspensão de esporo. Nos frascos que não foram tratados por calor com esporos e não continham compostos fenólicos havia uma quantidade notável de bactérias e leveduras contaminantes diferentes. Nenhum meio contendo compostos fenólicos foi contaminado. Após 2 dias de incubação nos frascos que não foram inoculados nem tratados por calor, a levedura contaminante começou a se desenvolver. No final dos cultivos, o fungo se desenvolveu bem em todos os frascos que foram inoculados com esporos. Nenhum micróbio contaminante foi detectado entre os mesmos. Nos frascos não inoculados e que não foram tratados por calor, também foi detectada uma contaminação bacteriana além de leveduras anteriormente mencionadas. Em contrapartida, os frascos que não continham inóculos, porém foram tratados por calor continuaram se desenvolvendo livremente até o final dos experimentos.

[00198] Com base nesses resultados, o tratamento térmico a 80°C juntamente com a adição de compostos fenólicos poderia ser capaz de manter os cultivos à base de hemicelulose livres de micróbios contaminantes comuns. Por outro lado, deve ser observado que sem compostos fenólicos o meio de crescimento sem tratamento térmico é facilmente contaminado, então, a partir do ponto de vista de higiene, ambas as operações, a adição de compostos fenólicos e tratamento térmico leve são necessárias.

EXEMPLO 6 - PRODUÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO EM AÇÚCARES HEMICELULÓSICOS

[00199] Os experimentos foram feitos usando um lipídeo que produz a cepa fúngica *A.oryzae*. A partir da esporulação de fungos de-

envolvidos em placas PDA, uma suspensão de esporo foi feita adicionando-se 12 ml de água estéril e os esporos foram removidos por raspagem com uma alça de inoculação ao líquido. 24 ml da suspensão de esporo foram usados para a inoculação de 6 frascos. A composição de meio é apresentada na tabela 10. Os frascos incubados foram incubados a 30 C com agitação em 160 rpm por 1 dia e, então, usados para inoculação de fermentador.

TABELA 10: COMPOSIÇÃO DE MEIO DE INOCULAÇÃO, PH AJUSTADO PARA 5,5.

	g/l
Açúcares hemicelulósicos	40
Extrato de levedura	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ *7H ₂ O	1
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

[00200] O líquido de auto-hidrólise D (contendo açúcares hemicelulósicos parcialmente em forma oligomérica) foi usado e o mesmo continha 4,2 g/l de compostos fenólicos com base na análise com o método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). O cultivo foi feito em um fermentador Biostat B plus 5 l em volume de 3 l e, enquanto isso, foi ajustado para 400 rpm, o pH foi mantido em 5,5 com 3 M de NaOH, a aeração era 1 vvm e a temperatura 30 C. A composição de meio é apresentada na tabela 11.

TABELA 11: A COMPOSIÇÃO DE MEIO DE FERMENTAÇÃO

Componentes de meio	Concentração (g/l)
Açúcares hemicelulósicos	60
Extrato de levedura	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgCl * 6 H ₂ O	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

RESULTADOS:

[00201] Durante o cultivo, a solução hemicelulósica foi adicionada em pequenos lotes. No total, 150 g de hemicelulose foram adicionados. Parte dos açúcares adicionados foi deixada inutilizada no final da fermentação. Em 142 h, quando o cultivo terminou, havia 14 g/l de biomassa, desses, 21% de lipídeos. Poderia ser concluído que a produção de óleo microbiano a partir de açúcares hemicelulósicos de palha de trigo (parcialmente em forma oligomérica) foi bem-sucedida. Na fermentação, a concentração de compostos fenólicos era 2,8 g/L. Portanto, também poderia-se afirmar que o crescimento fúngico foi possível apesar de altas concentrações de inibidor.

EXEMPLO 7 - EFEITO DE FURFURAL SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO**CONDIÇÕES DE CULTIVO**

[00202] Duas cepas fúngicas *Aspergillus oryzae* TKK-4 e *Mortierella isabellina* TKK-1 e uma cepa de levedura *Lipomyces starkeyi* TKK-1 foram cultivadas em frascos em um meio padrão (Tabela 12) com a

adição de furfural. Os micro-organismos foram desenvolvidos por 6 dias a 28°C com 160 rpm (para fungos) e 250 rpm (para levedura). Celulose foi adicionada para ajudar no crescimento de fungo com uma melhor morfologia. Furfural foi adicionado em diferentes quantidades no meio (0 a 4 g/l) e o crescimento dos micro-organismos foi observado.

TABELA 12. COMPONENTES DE MEIO.

Componente de meio	g/l
Extrato de malte	30
Peptona	3
Dextrose monoidratada	20
Celulose	2

RESULTADOS

[00203] Após uma semana, *A. oryzae* TKK-4 se desenvolveu em 0,5 g/l de furfural, porém concentrações maiores (> 0,75 g/l) inibiram o crescimento completamente. *M. isabellina* TKK-1 não se desenvolveu em > 1 g/l furfural, porém após 4 a 6 dias, algum crescimento foi observado em 0,8 g/l. *L. starkeyi* TKK-1 era mais tolerante a furfural. A mesma se desenvolveu em 1,2 g/l de furfural após alguns dias. A concentração inibitória era > 1,8 g/l. A Tabela 13 mostra as concentrações de peso seco para os cultivos em frasco com a concentração de furfural de 0 a 1,2 g/l.

TABELA 13. A concentração de peso seco medida após 6 dias de cultivo em fungos *A. oryzae* TKK-4 e *M. isabellina* TKK-1 e levedura *L. starkeyi* TKK-1, quando a concentração de furfural era 0 a 1,2 g/l.

	<i>A. oryzae</i> TKK4	<i>M. isabellina</i> TKK-1	<i>L. starkeyi</i> TKK-1
Furfural (g/l)	DW (g/l)		
0	18,02	16,17	14,46
0,1	18,18		
0,2	16,54	7,02	
0,3	13,53		
0,4	11,58	13,80	
0,6		14,96	14,79
0,8		9,28	
1,2			14,39

EXEMPLO 8 - AUTO-HIDRÓLISE (COM PH PRÉ-AJUSTADO) DE PALHA DE TRIGO

[00204] Uma suspensão foi preparada misturando-se 20 g de palha de trigo anteriormente triturada para passar por uma tela de 1 mm e 180 g de água. A suspensão foi ajustada com ácido acético a pH 4,5. A suspensão foi transferida para um reator de autoclave que foi, então, não isotermicamente aquecido com uma camisa de aquecimento entre 170°C e 200°C com agitação contínua. Os dados de temperatura durante o aquecimento foram registrados e usados para calcular a severidade de auto-hidrólise (Eq. 1). O reator foi resfriado a aproximadamente 50 C, e a suspensão foi manualmente recuperada por filtração. A fração líquida foi separada da fração sólida e furfural e hidroximetilfurfural (HMF) na fração líquida foram medidos usando HPLC. A concentração total de açúcar (g/l) na fração líquida foi determinada

após a hidrólise ácida diluída que converte açúcares oligoméricos e poliméricos em monossacarídeos. A fração sólida foi lavada com água (0,5 dm³) e prensada.

[00205] O resíduo sólido obtido foi pesado, amostrado para determinação de matéria seca e o rendimento de resíduo sólido (%) foi calculado como a razão de peso de resíduo sólido para a palha de trigo pesada no tratamento de auto-hidrólise (100%*g de palha de trigo seca/g resíduo sólido seco). As substâncias fenólicas solúveis no líquido foram determinadas usando o método de Folin-ciocalteu com guaiacol como padrão.

[00206] Os resultados mostrados na Figura 2 e Figura 3 resumem os resultados. O rendimento de resíduo sólido diminuiu com a severidade de auto-hidrólise com 67% rendimento na severidade mais alta (Log(R0)=4,4) (Figura 2). A concentração de açúcares de monossacarídeo na fração líquida, primeiro, aumentou e, então, diminuiu com o aumento de severidade de auto-hidrólise. A concentração máxima de açúcar (23,1 g/l) foi obtida quando a severidade de auto-hidrólise era Log(R0)=3,8. Além dessa severidade de auto-hidrólise, a concentração de açúcar na fração líquida diminuiu drasticamente e a concentração de furfural e HMF aumentou repentinamente alcançando uma concentração de 4,8 g/l e 0,3 g/l, respectivamente. Ao contrário da geração repentina de furfural e HMF, a concentração de compostos fenólicos solúveis aumentou progressivamente a partir de 0,5 g/l até 2,0 g/l com severidade de auto-hidrólise aumentada.

[00207] Esse exemplo mostra que as condições de auto-hidrólise ideais em termos de severidade de auto-hidrólise (Log(R0)) podem ser selecionadas para evitar o excesso de formação de furfural, HMF, e compostos fenólicos solúveis enquanto aumenta a concentração de monossacarídeos na fração líquida.

REFERÊNCIAS

Suutari, M., Liukkonen, K. ja Laakso, S., Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids, J. Gen. Microbiol. 136 (1990) 1496-1474.

Waterhouse AL. 2002. Determination of total phenolics. In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, editors. Current protocols in food analytical chemistry. 1st ed. New York : John Wiley & Sons, Inc. p 11.1.1–11.1.8.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir lipídeos, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas

(i) fornecer um meio de cultivo compreendendo um hidrolisado lignocelulósico,

(ii) fornecer um caldo de fermentação inoculando-se o meio de cultivo de (i) com um primeiro micróbio, em que o dito primeiro micróbio é um micróbio oleaginoso, que é capaz de acumular lipídeos intercelulares de modo que os lipídeos equivalham a pelo menos 15% (p/p) da biomassa total (por peso seco de célula) do micróbio quando o mesmo é cultivado sob condições adequadas,

(iii) incubar o dito meio inoculado com o dito primeiro micróbio sob condições aeróbicas permitindo que os lipídeos se acumulem,

em que o dito caldo de fermentação compreende pelo menos um inibidor de crescimento microbiano selecionado do grupo consistindo em compostos fenólicos, ácidos orgânicos, furfural e hidróxi-metilfurfural, e

em que o dito caldo de fermentação compreende adicionalmente um segundo micróbio não oleaginoso, cuja capacidade de acumular lipídeos intercelulares está abaixo de 15% (p/p) da biomassa total (por peso seco de célula) quando o mesmo é cultivado sob condições adequadas,

em que o dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano está presente no dito caldo de fermentação em uma concentração dentro da faixa que permite o primeiro micróbio se proliferar e/ou para produzir óleo e inibir a proliferação do dito segundo micróbio por pelo menos 20%, e

em que a presença do inibidor de crescimento microbiano inibe a proliferação do dito segundo micróbio e favorece a proliferação do dito primeiro micróbio sobre o dito segundo micróbio.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito segundo micróbio está presente no meio de cultivo fornecido na etapa (i) ou contaminou o caldo de fermentação na etapa (ii) ou (iii).

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma etapa de adicionar o dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano ou ajustar a concentração do dito pelo menos um inibidor de crescimento microbiano no caldo de fermentação.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que pelo menos um inibidor de crescimento microbiano é o grupo de compostos fenólicos medido como a concentração de fenóis totais por volume de caldo de fermentação.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o nível de ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação é pelo menos 1 g/l.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que o nível de ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação está na faixa de 1 g/l a 7 g/l.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de que o nível de ditos compostos fenólicos no dito caldo de fermentação está dentro da faixa de 1 g/l a 5 g/l, de preferência, dentro da faixa de 1 g/l a 3 g/l.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro micróbio é selecionado a partir da lista que consiste em fungos filamentosos, levedura, bactérias ou algas.

9. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro micróbio é selecionado a partir do grupo consistindo em *Mortierella*, *Aspergillus*, *Li-*

pomyces, *Rhodospiridium* e *Cryptococcus*.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 9, caracterizado pelo fato de que o dito segundo micróbio é não oleaginoso selecionado a partir da lista que consiste em bactérias, levedura, fungos filamentosos ou microalgas.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 10, caracterizado pelo fato de que o dito segundo micróbio é uma bactéria selecionada a partir do grupo que consiste em *Bacillus* spp. ou *Pseudomonas* spp.

FIG. 1

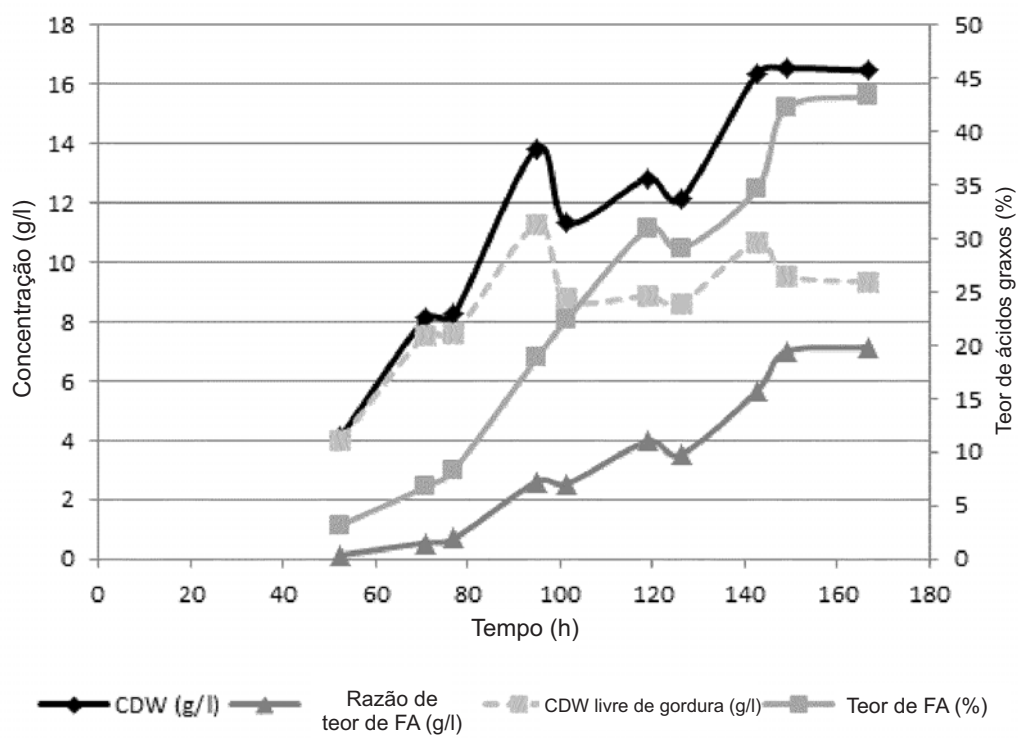


FIG. 2

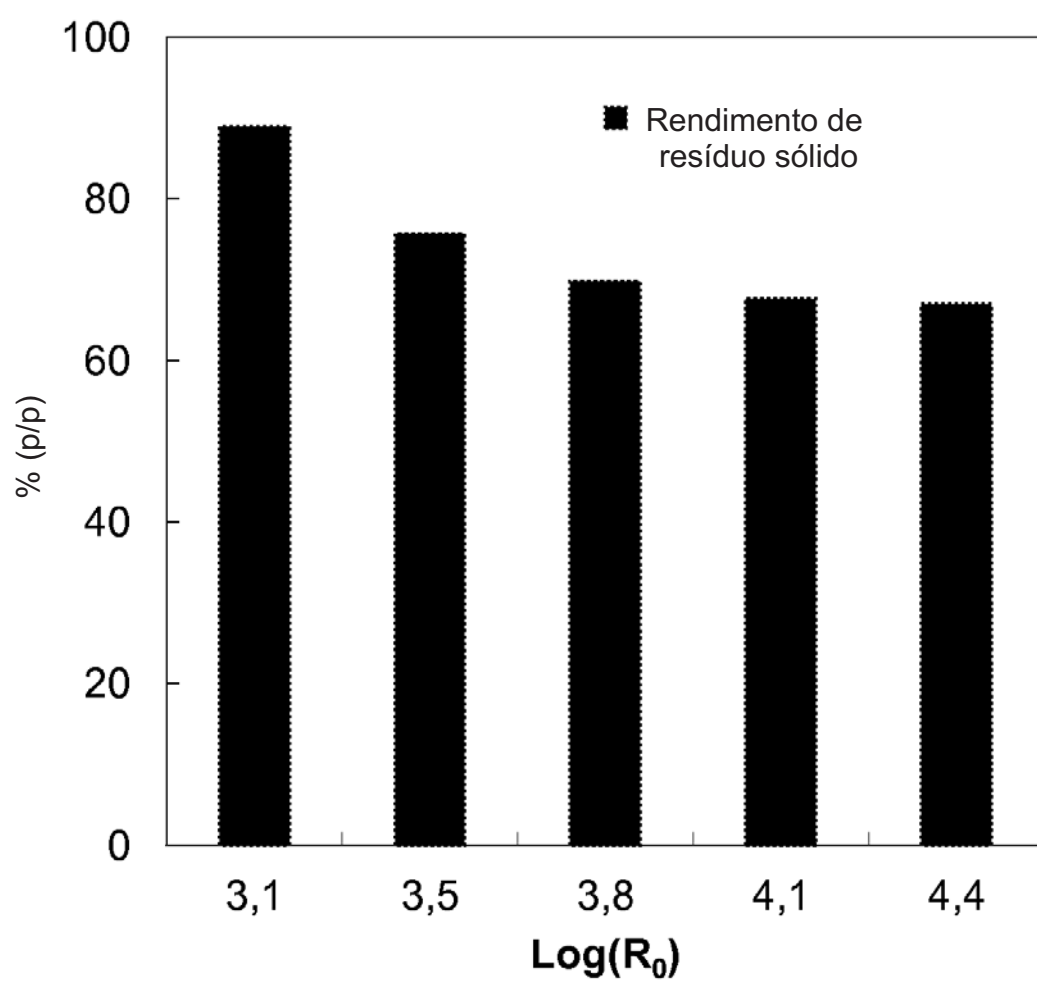


FIG. 3

