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

(11) PI 0509301-5 B1

(22) Data do Depósito: 16/03/2005

(45) Data de Concessão: 11/04/2017

(54) Título: PROCESSO PARA FERMENTAÇÃO DE AÇUCARES CONTENDO SACARÍDEOS OLIGOMÉRICOS

(51) Int.Cl.: C12P 19/04

(30) Prioridade Unionista: 31/03/2004 US 60/558,266

(73) Titular(es): NATUREWORKS LLC

(72) Inventor(es): DANIEL R. BEACOM; JEFFREY L. KOLSTAD; DAVID H. REEDER; BRIAN J.RUSH

"PROCESSO PARA FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES CONTENDO SACARÍDEOS OLIGOMÉRICOS"

A presente invenção se relaciona a um processo para fermentação de monossacarídeos que contêm quantidades de materiais de polissacarídeos.

Os processos de fermentação são usados comercialmente em grande escala para produzir moléculas orgânicas como etanol, ácido cítrico e ácido láctico. Naqueles processos, um carboidrato é alimentado a um microrganismo que é capaz de metabolizá-lo ao produto da fermentação desejado. O carboidrato e o microrganismo são selecionados em conjunto para que o microrganismo seja capaz de eficientemente digerir o carboidrato para formar o produto que é desejado com bom rendimento. Está ficando mais comum usar microrganismos geneticamente projetados nesses processos, para otimizar rendimentos e variáveis de processo, ou permitir que determinados carboidratos sejam metabolizados.

O amido é uma fonte de carboidrato amplamente disponível e barata. Está disponível a partir de uma ampla variedade de fontes de vegetais como milho, trigo, arroz, cevada, e assim por diante. Muitos microrganismos não são capazes de metabolizar o amido diretamente, mas sim são capazes de metabolizá-lo lentamente e ineficientemente. Conseqüentemente, é muito comum tratar o amido antes de alimentá-lo no processo de fermentação, para rompê-lo em monossacarídeos que o microrganismo pode fermentar facilmente.

Normalmente, o amido é hidrolisado para formar uma mistura que contém principalmente glicose (isto é, dextro-

se). Contudo, a hidrólise completa à glicose acrescenta um custo significante, assim os produtos de glicose que estão comercialmente disponíveis tendem a conter uma pequena quantidade de frutose e vários polissacarídeos oligoméricos. Infelizmente, muitos microrganismos também não podem metabolizar os oligômeros, e, portanto esses valores de carboidrato acabam desperdiçados. Além disso, a presença desses oligômeros complica a recuperação do produto da fermentação desejado do meio de fermentação.

São conhecidos os assim chamados processos de sacarificação e fermentação simultâneos (SSF) nos quais um amido não hidrolisado é alimentado em um processo de fermentação em conjunto com enzimas que catalisam a quebra do amido até monossacarídeos. Os monossacarídeos são produzidos e simultaneamente fermentados ao produto desejado. No entanto, os processos de SSF sofrem de várias desvantagens. O amido que é alimentado em processos de SSF tipicamente não é estéril. O mesmo é verdadeiro para as enzimas. Assim, a esterilização deve ser executada no vaso de fermentação, e isso tende a ser um gasto intensivo e ineficiente de energia. Além disso, como a glicose é produzida, ele tende a desativar as enzimas e reduzir a velocidade das taxas totais de produção.

Conseqüentemente, seria desejável um processo melhorado pelo qual as matérias-primas de monossacarídeos que contenham quantidades de açúcares oligoméricos possam ser fermentadas eficientemente.

Em um aspecto, a presente invenção é um processo de fermentação que submete um caldo de fermentação que contém 30 g/L ou menos de um monossacarídeo e de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L de um ou vários sacarídeos oligoméricos não fermentáveis a condições de fermentação na presença de (A) um microrganismo que fermenta o monossacarídeo mas que não fermenta os ditos sacarídeos oligoméricos não fermentáveis e (B) uma quantidade eficaz de pelo menos uma enzima ativa que despolimeriza pelo menos um dos ditos sacarídeos oligoméricos não fermentáveis para formar um monossacarídeo que é fermentável pelo microrganismo, em condições tais que a despolimerização do sacarídeo oligomérico não fermentável e a fermentação dos monossacarídeos ocorram simultaneamente.

Em um segundo aspecto, a presente invenção é um processo para fermentação de um substrato de fermentação na presença de um microrganismo, compreendendo:

(A) formação de um caldo de fermentação inicial que contém (1) um substrato de fermentação, do qual (a) de aproximadamente 75 % a aproximadamente 98 % em peso é um monossacarídeo que é fermentável pelo microrganismo em um produto de fermentação desejado, e (b) de aproximadamente 2 % a aproximadamente 25 % em peso é um ou vários sacarídeos oligoméricos que não são fermentáveis pelo microrganismo ao produto da fermentação desejado, no qual o caldo de fermentação inicial contém pelo menos 30 g/L do monossacarídeo;

(B) fermentação do caldo de fermentação inicial na presença do microrganismo em condições suficientes para fer-

mentar o monossacarídeo e reduzir a concentração de monossacarídeo no caldo de fermentação a menos do que aproximadamente 30 g/L;

(C) acrescentar então ao caldo de fermentação ativo uma quantidade eficaz de pelo menos uma enzima que despolimerize pelo menos um sacarídeo oligomérico no caldo de fermentação para formar um monossacarídeo que é fermentável pelo microrganismo para formar um produto da fermentação desejado;

(D) e então sujeição do caldo de fermentação a condições suficientes para simultaneamente despolimerizar pelo menos um sacarídeo oligomérico e fermentar monossacarídeos para formar o produto da fermentação desejado.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção é um processo de fermentação compreendendo a fermentação de um caldo de fermentação que contém até 30 g/L de glicose e de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L de oligômeros não fermentáveis de glicose na presença de (A) um microrganismo que fermenta a glicose mas não fermenta os ditos oligômeros de glicose não fermentáveis e (B) uma quantidade eficaz de pelo menos uma enzima ativa que despolimerize pelo menos um dito oligômero da glicose não fermentável para formar um monossacarídeo que é fermentável pelo microrganismo, em condições tais que a despolimerização dos oligômeros da glicose não fermentáveis ocorre simultaneamente com a fermentação da glicose e do monossacarídeo.

Foi surpreendentemente encontrado que a despolimerização enzimática de sacarídeos oligoméricos pode ocorrer

com boas taxas na presença de concentrações significantes de monossacarídeos. Isso permite a fermentação e despolimerização simultâneas de oligômeros, sem inativação significante das enzimas ou a reforma de 1 a 6 oligômeros. Este processo fornece um método de fermentação eficiente no qual uma matéria-prima de carboidrato relativamente barato pode ser usado e são obtidos rendimentos muito altos do produto da fermentação desejado em taxas comercialmente razoáveis.

O "monossacarídeo fermentável" é um açúcar que pode ser fermentado pelo microrganismo que é usado no processo, para formar um produto da fermentação desejado. O monossacarídeo fermentável é preferivelmente um açúcar pentose ou hexose. Um açúcar hexose preferencial em particular é a glicose. O "sacarídeo oligomérico não fermentável" é um carboidrato oligomérico no qual duas ou mais unidades de monossacarídeo são ligadas em conjunto via ligações de éter. O sacarídeo oligomérico é "não fermentável", significando que não pode ser fermentado pelo microrganismo ao produto da fermentação desejado, ou que a taxa da sua fermentação está em não mais do que aproximadamente 5 % da taxa na qual o microrganismo fermenta o monossacarídeo fermentável nas condições usadas no processo. O grau de polimerização é preferivelmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, especialmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o mais preferivelmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 3. No caso onde são açúcares oligoméricos de hexoses, são adequados os que têm ligação de éter 1 -> 4 ou 1 -> 6, embora sejam preferidos os que têm ligação de éter 1 -> 4. Os sacarí-

dios oligoméricos não fermentáveis especialmente preferíveis incluem oligômeros de glicose como a maltose, a maltotriose e a isomaltotriose (todos possuindo ligações de éter 1 -> 4), ismaltose (possuindo ligação de éter 1 -> 6), e panose (possuindo tanto ligação de éter 1 -> 4 quanto 1 -> 6).

O hidrolizado de amido comercialmente disponível contém aproximadamente de 80 % a aproximadamente 98 % em peso de glicose (baseado em carboidratos), especialmente de aproximadamente 90 % a aproximadamente 96 % em peso de glicose (um monossacarídeo fermentável) e de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % (baseado em carboidratos, glicose), especialmente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 9 % de oligômeros que tendem a ser não-fermentáveis. Esses hidrolisados também podem conter pequenas quantidades (até aproximadamente 2 % em peso, baseado em carboidratos) de frutose e outros carboidratos. Tais hidrolisados de amido são um substrato de fermentação particularmente preferido para uso de acordo com a presente invenção.

Na presente invenção, ocorre a fermentação e a despolimerização enzimática simultâneas do oligômero. No processo, as enzimas ativas são acrescentadas a um caldo de fermentação até aproximadamente 30 g/L do monossacarídeo fermentável. Concentrações mais altas de monossacarídeo tendem a reduzir a eficiência da reação de despolimerização enzimática, e são, por isso, indesejáveis. Além disso, algumas enzimas catalisarão a formação de 1 -> 6 polissacarídeos oligômeros na presença de altas concentrações de monossacarídeos. A concentração de monossacarídeo é preferivelmente até apro-

ximadamente 26 e mais preferivelmente até aproximadamente 20 g/L do mesmo.

O caldo contém até aproximadamente 10 g/L do sacarídeo oligomérico não fermentável, preferivelmente de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 8 g/L e mais preferivelmente aproximadamente 3 g/L a aproximadamente 6 g/L do mesmo. O caldo de fermentação então é submetido a condições nas quais o monossacarídeo fermentável é fermentado ao mesmo tempo pelo menos um dos sacarídeos oligoméricos não fermentáveis é despolimerizado. Os monossacarídeos que são produzidos na reação de despolimerização (que podem ser os mesmos ou diferentes dos monossacarídeos fermentáveis iniciais) também são fermentados. A despolimerização enzimática e a fermentação simultâneas fornecem rendimentos excelentes e boas taxas de fermentação.

É normalmente mais econômico começar uma fermentação com uma concentração muito mais alta do monossacarídeo fermentável. Uma modalidade preferencial da presente invenção, desse modo, é um processo no qual um caldo de fermentação inicial contendo acima de 30 g/L (preferivelmente pelo menos 40 g/L, mais preferivelmente pelo menos 50 g/L, especialmente pelo menos 55 g/L) de monossacarídeo é fermentado até que a concentração de monossacarídeo seja reduzida até abaixo de 30 g/L, preferivelmente abaixo de 26 g/L e mais preferivelmente abaixo de 5 g/L. A(s) enzima(s) então é acrescentada e é realizada a fermentação simultânea com a fermentação do oligômero. Esta modalidade da invenção permite que se tire proveito da melhor economia que vêm com a u-

tilização das mais altas concentrações iniciais dos materiais de partida.

Qualquer enzima que seja capaz de despolimerizar o oligômero não fermentável pode aqui ser usada. O tipo específico da enzima que é usada é selecionado em relação aos determinados sacarídeos oligoméricos que estejam presentes no caldo de fermentação. As enzimas de particular interesse atacam a ligação éter 1 -> 4 ou uma ligação éter 1 -> 6 (ou ambas) de um sacarídeo oligomérico. Uma enzima preferida para despolimerização de oligômeros com ligações 1 -> 4 é a α-glicosidase (glicoamylase). Uma enzima preferida para despolimerização de oligômeros com ligações 1 -> 6 é a transglicosidase. As misturas de α-glicosidase e transglicosidase são preferidas quando sacarídeos oligoméricos de cada tipo estão presentes. Essas enzimas estão comercialmente disponíveis através da, por exemplo, *Enzyme Biosystems* (G-ZYME 99 SP, um produto de α-glicosidase) e *Genencor* (Transglicosidase L-500). Em alguns exemplos, os graus comerciais de α-glicosidase não são altamente refinados, e contêm várias quantidades de outras enzimas que atacam a ligação 1 -> 4 e/ou a ligação 1 -> 6 de sacarídeos oligoméricos. Esses graus "crus" de α- glicosidase estão entre os tipos preferenciais de enzimas. Um exemplo de um tal grau de "cru" é a GC702, da *Genencor*.

A quantidade de enzima que é usada dependerá de algum modo, da enzima em particular, da taxa desejada de reação, e do determinado(s) polissacarídeo(s) oligomérico que estejam presentes. Tipicamente, a enzima é utilizada em uma

quantidade suficiente para fornecer aproximadamente de 5 a 10.000 μL de enzima / L do caldo de fermentação. Uma quantidade mais preferencial é de aproximadamente de 10 a 1.000 μL / L, e uma quantidade ainda mais preferencial é de aproximadamente de 25 a 500 μL / L.

Exemplos de produtos químicos que são produzidos em produtos comerciais para fermentação são o etanol, o ácido lático, o ácido cítrico, o ácido malônico, o ácido hidroxi butírico e o ácido acético.

O microrganismo é aquele que pode fermentar o monossacarídeo fermentável ao produto da fermentação desejado. Como tal, o determinado microrganismo usado é selecionado em relação ao substrato de fermentação, bem como o produto da fermentação que é desejado. O microrganismo pode ser de ocorrência natural, ou pode ser um mutante ou uma cepa recombinante. Os exemplos de microrganismos incluem vária espécie de bacilos, lactobacilos e leveduras, inclusive dos tipos selvagens e dos tipos mutado ou recombinante.

Microrganismos adequados úteis para produzir o ácido láctico incluem bactérias do tipo selvagem dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Estreptococo* e fungos do tipo selvagem dos gêneros *Rhizopus*. Além disso, são adequadas as cepas de leveduras recombinantes os gêneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Trichosporon* ou *Yamadazyma*, possuindo genes de LDH exógenos. Tais cepas de levedura recombinante são descritas por exemplo em WO 99/14335, WO 00/71738 e WO 02/42471. O caldo de fermentação também incluirá a água e preferivelmente incluirá nutrien-

tes, como proteínas (ou outra fonte de nitrogênio), vitaminas e sais minerais, que são necessários ou desejáveis para a função de célula. Outros componentes também podem estar presentes no caldo de fermentação, tais como agentes tamponadores, produtos de fermentação (que tendem a se acumular com os progressos da fermentação) e outro metabólitos. Em casos onde a fermentação é um ácido, é comum tamponar o caldo com uma base como hidróxido de cálcio ou carbonato de cálcio, para manter um pH no qual o microrganismo funcione bem. As condições são selecionadas para que a fermentação e despolimerização enzimática dos oligômeros ocorram simultaneamente. Embora as condições possam variar dependendo de um determinado microrganismo, da enzima e do produto da fermentação desejado, as condições típicas incluem uma temperatura de aproximadamente 20°C, preferivelmente de aproximadamente 30°C até aproximadamente 50°C, mais preferivelmente aproximadamente 45°C. Normalmente a mistura de reação é agitada. O processo pode ser realizado em modo de batelada, modo semi-contínuo e modo contínuo.

O processo é preferivelmente continuado até que o máximo de substrato de fermentação seja convertido no produto da fermentação desejado conforme seja economicamente viável. É reconhecido, contudo, que em muitos exemplos não será economicamente viável tentar fermentar 100% do substrato. É preferível conduzir o processo para que pelo menos 50 %, mais preferivelmente pelo menos 60 %, especialmente pelo menos 75 %, dos oligômeros não fermentáveis sejam convertidos a monossacarídeos fermentáveis e fermentados ao produto de-

sejado. As concentrações finais de oligômeros não fermentável são preferivelmente abaixo de aproximadamente 3 g/L, mais preferivelmente abaixo de aproximadamente 2 g/L, e especialmente abaixo de aproximadamente 1 g/L. As concentrações finais de monossacarídeos fermentáveis estão preferivelmente abaixo de 1 g/L, e especialmente abaixo de 0,1 g/L.

O produto da fermentação é recuperado do caldo de fermentação. A maneira de realizar essa recuperação dependerá do produto em particular. Contudo, em geral, o microrganismo é separado da fase líquida, tipicamente via uma etapa de filtração, e o produto é recuperado via, por exemplo, destilação, extração, cristalização, separação de membrana, osmose, osmose inversa ou outra técnica adequada.

Aproximadamente 4.000 L de um caldo de fermentação aquoso que contém um xarope de glicose de 95 %, o bastante para fornecer 153 g de glicose/kg do caldo preparado. O xarope de dextrose de 95 % contém vária espécies oligoméricas tal como mostrado na Tabela 1, abaixo. O caldo de fermentação inclui um pacote nutrientes para promover o crescimento e a atividade do microrganismo.

O caldo é fermentado para produzir o ácido láctico a 45°C utilizando uma bactéria em uma concentração de aproximadamente 4g de células/L. A cal é acrescentada conforme necessário para manter o pH do caldo em aproximadamente 6,2. O ácido láctico (na forma do sal de cálcio) é produzido pela taxa de aproximadamente 1,6 g/kg/hr. A fermentação é continuada até que a concentração de glicose no caldo seja reduzida abaixo de 7 g/L. 400 μL/L de α-glicosidase e 25 mL/L de

trans-glicosidase são acrescentados. Uma amostra do caldo é tomada e analisada para a glicose, maltose, isomaltose, maltotriose, panose e isomaltotriose, com os resultados seguintes:

TABELA 1

Sacarídeo	Concentração (g/L)
Glicose	6,730
Maltose	3,158
Isomaltose	1,390
Maltotriose	0,033
Panose	0,768
Isomaltose	0,062
Total de oligômeros	5,932

No momento da adição de enzima, a concentração de ácido lático é 121 g/kg. Depois da adição de enzima, a fermentação é continuada nas mesmas condições que antes. Uma amostra do caldo é tomada em vários intervalos e analisada para sacarídeos como antes. Os resultados são como se segue:

TABELA 2

Sacarídeos	Tempo			
	4h	9h	25,5h	63h
Glicose	1,110	0,090	0,058	~0
Maltose	0,000	0,000	0,000	0,000
Isomaltose	1,267	1,152	0,353	0,000

Maltotriose	0,000	0,040	0,000	0,000
Panose	0,396	0,376	0,028	0,042
Isomaltotriose	0,100	0,092	0,037	0,050
Total de oligomeros	1,762	1,660	0,418	0,092

Os dados na Tabela 2 mostram que todos os cinco dos sacarídeos oligoméricos avaliados foram substancialmente despolimerizados depois da adição de enzima. A fermentação simultânea é indicada pelos níveis de glicose, que continuaram caindo em todas as partes do processo embora a glicose adicional fosse gerada como os oligômeros foram despolimerizados. Em geral as concentrações de substrate são reduzidas neste exemplo de 153 g/L a menos de 0,1 g/L. A concentração láctica final é 126 g/kg do caldo.

Uma outra fermentação é executada em uma menor escala, que usa aproximadamente 1,9 L de um caldo de fermentação semelhante ao descrito na Tabela 1, exceto que a concentração de glicose inicial é aproximadamente 125 g/L. A fermentação é conduzida durante aproximadamente 35 horas nas condições descritas no Exemplo 1, em cujo tempo a concentração de glicose é reduzida a 26 g/L. Uma amostra é tomada neste ponto e analisada para sacarídeos. 400 μL/L de α-glicosidase então são acrescentados e a fermentação continuada nas mesmas condições. As amostras são tomadas em 3, 8 e 27 horas depois da adição de enzima, com resultados tal como mostrado na Tabela 3.

TABELA 3

Sacarídeos	Tempo			
	Na hora da adição da enzima	3h	8h	27h
Glicose	26,00	18,90	10,20	0,091
Maltose	2,905	0,545	0,496	0,309
Isomaltose	1,420	1,361	1,292	1,095
Maltotriose	0,188	0,000	0,000	0,000
Panose	0,505	0,217	0,105	0,131
Isomaltotriose	0,159	0,111	0,066	0,068
Total de oligomeros	4,367	2,234	1,959	1,603

Os dados na Tabela 3 novamente mostram que a fermentação e despolimerização enzimática do polissacarídeo ocorreram simultaneamente nessas condições. Neste exemplo, os oligômeros que possuem ligações de éter 1 -> 4 são convertidos com um bom rendimento a monossacarídeos. A isomaltose não é significativamente despolimerizada neste exemplo porque a α-glicosidase não promove eficientemente a hidrólise da ligação de éter 1 -> 6 que existe na isomaltose.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para fermentação de um substrato de fermentação na presença de um microrganismo **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(A) formar um caldo de fermentação inicial que contém (1) um hidrolisado de amido contendo de 80 a 98 por cento em peso de glicose com base em carboidratos e de 1 a 20 por cento em peso de oligômeros de glicose possuindo um grau de polimerização de 2 a 5, em que o caldo de fermentação inicial contém pelo menos 50 g/L da glicose;

(B) fermentar o caldo de fermentação inicial na presença do microrganismo para fermentar a glicose e reduzir a concentração de glicose no caldo de fermentação para menos do que 30 g/L;

(C) acrescentar então ao caldo de fermentação 5 a 10.000 µL por litro de caldo de fermentação de pelo menos uma enzima que despolimeriza pelo menos um oligômero de glicose no caldo de fermentação para formar glicose; em que a referida enzima é uma enzima que ataca a ligação éter 1 -> 4 ou uma ligação éter 1 -> 6 (ou ambas)de um sacarídeo oligomérico; em que a enzima preferida para despolimerização de oligômeros com ligações 1 -> 4 é a α-glicosidase (glicoamylase), a enzima preferida para a despolimerização de oligômeros com ligações 1 -> 6 é a trans-glicosidase e uma mistura de ambos é preferida quando sacarídeos oligoméricos de cada tipo estão presentes;

(D) e, então, simultaneamente despolimerizar os oligômeros de glicose e fermentar a glicose.