



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento Industrial
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1101598-5 A2



(22) Data de Depósito: 19/04/2011
(43) Data da Publicação: 24/12/2013
(RPI 2242)

(51) Int.Cl.:

C12N 9/42
C12N 9/24
C12P 19/02
C12P 7/10
C13K 1/02

(54) Título: MÉTODO, BIOPRODUTO, SISTEMA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM BIOPRODUTO E ESTIMULANTE

(30) Prioridade Unionista: 19/04/2010 US 12/763,102

(73) Titular(es): BOARD OF TRUSTEES OF MICHIGAN STATE UNIVERSITY

(72) Inventor(es): BRUCE DALE, MING WOEI LAU, SHISHIR CHUNDAWAT, VENKATESH BALAN

(57) Resumo: MÉTODO, BIOPRODUTO, SISTEMA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM BIOPRODUTO E ESTIMULANTE A presente invenção trata de métodos para tratar a biomassa de planta com amônia para fornecer uma biomassa de planta pré-tratada com amônia e usar a biomassa de planta pré-tratada com amônia para estimular o crescimento ou promover a síntese de enzima e um microorganismo produtor de enzima. O processo pode ser econômica e eficientemente realizado em uma instalação de produção de bioproduto.

“MÉTODO, BIOPRODUTO, SISTEMA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM BIOPRODUTO E ESTIMULANTE”

O presente pedido reivindica prioridade sobre Pedido de Patente Número série US 12/763.102, depositado no dia 19 de abril 2010, o qual é
5 especificamente incorporado aqui a título de referência integralmente.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A biomassa celulósica pode ser usada para a produção de diversos bioprodutos. Entretanto, muitos métodos convencionais são muito dispendiosos e exigem altas despesas de investimento, como reatores de alta
10 pressão e grandes quantidades de aditivos.

Os inventores são os primeiros a reconhecer a necessidade de métodos aperfeiçoados de produção de bioprodutos provenientes da biomassa celulósica.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

15 Um aspecto da invenção é um método que compreende: tratamento da biomassa de planta com um pré-tratamento de amônia para fornecer uma biomassa de planta tratada com amônia, em que a biomassa de planta é de uma ou mais plantas; e utilização da biomassa de planta tratada com amônia para estimular o crescimento ou promover a síntese de enzima em
20 um microorganismo produtor de enzima.

Em algumas modalidades, a biomassa de planta alcalina tratada com amônia contém solúveis e/ou sólidos que estimulam o crescimento ou promovem a síntese de enzima celulase no microorganismo produtor de enzima.

25 Os métodos descritos aqui também podem incluir extrair pelo menos uma porção dos solúveis da biomassa de planta alcalina tratada com amônia com um solvente para produzir, desse modo, um extrato solúvel e uma biomassa pré-tratada lavada. Em algumas modalidades, o extrato solúvel é

usado para estimular o crescimento ou promover a síntese de enzima celulase em um microorganismo produtor de enzima. Além disso, a biomassa pré-tratada lavada também pode ser usada para estimular o crescimento ou promover a síntese de enzima celulase em um microorganismo produtor de
5 enzima.

Os métodos descritos aqui podem ser realizados em uma instalação de produção de bio-produto que utiliza a biomassa de planta tratada com amônia para produzir um bio-produto em uma unidade de produção de bioproduto. Em algumas modalidades, o microorganismo produtor de enzima é
10 contido em uma unidade de produção de enzima que compreende opcionalmente o extrato solúvel, a biomassa pré-tratada lavada e/ou um bio-produto que contém nutriente da unidade de produção de bioproduto.

Em algumas realizações, a enzima produzida pelo microorganismo que produz enzima é uma enzima sacarolítica. Por exemplo, a
15 enzima sacarolítica pode ser selecionada a partir de exoglucanases, endoglucanases, β -xilosidases, endoxilanas, α -arabinofuranosidases, proteína induzida de celulose 2, α -arabinofuranosidases, acetil xilano esterases, α -glucuronidases, endoxilanas, poligalaturonases, α -galactosidases, acetil esterases e combinações destes.

20 O microorganismo que produz enzima é selecionado a partir de levedura, bactéria, fungo e combinações destes. Em algumas realizações, o microorganismo que produz enzima é selecionado a partir de *Trichoderma reesei* e *A. Awamori*.

O extrato solúvel obtido a partir da biomassa de planta alcalina
25 tratada com amônia pode incluir proteínas, vitaminas, açúcares simples, oligossacarídeos, lipídios e oligoelementos.

O solvente usado para extrair ao menos uma porção dos solúveis da biomassa de planta alcalina tratada com amônia pode ser água ou um

solvente de base aquosa. Em algumas realizações, o solvente é uma solução de hidróxido de amônia alcalina. Por exemplo, a solução de hidróxido de amônia alcalina pode incluir cerca de 0,01% a 30% NH_4OH por peso. Em algumas realizações, a solução de hidróxido de amônia alcalina aquosa tem
5 um pH entre cerca de 7 e 12.

O extrato solúvel contém um estimulante. Assim, o extrato solúvel e/ou o estimulante podem ser usados para estimular o cultivo em um microorganismo que produz enzima. O extrato solúvel e/ou o estimulante podem também ser usados para induzir ou estimular a produção de enzima em um microorganismo
10 que produz enzima. Tal estímulo de cultivo e/ou indução de enzima pode ser realizado separadamente ou simultaneamente, por exemplo, em uma unidade de produção de enzima.

A biomassa de planta pode ser derivada de uma ou mais plantas. Em algumas realizações a planta é uma monocotiledônea. Exemplos de uma
15 monocotiledônea a partir da qual a biomassa de planta pode ser obtida incluem grama, palha de milho, sorgo, bagaço de cana-de-açúcar, trigo, arroz, milho ou uma combinação destes. Em algumas realizações, a grama é *switchgrass*, *miscanthus*, grama junco-de-canário ou uma combinação destes. Em uma realização, a biomassa de planta é palha de milho.

20 O pré-tratamento com amônia pode ser realizado em uma variedade de formas com uso de uma variedade de materiais que contêm amônia. Em algumas realizações, o pré-tratamento com amônia compreende expansão de fibra por amônia.

O método descrito no presente pode ademais incluir a hidrólise da
25 biomassa de planta tratada com amônia com uma enzima para gerar uma pasta hidrolisada enzimática, em que a enzima é uma enzima secretada pelo microorganismo que produz enzima, a enzima está presente dentro ou a partir do extrato solúvel, e/ou a enzima está presente dentro ou a partir da biomassa

pré-tratada lavada.

A pasta hidrolisada enzimática pode ser mecanicamente processada para produzir um hidrolisado enzimático líquido que inclui uma mistura de açúcar fermentável.

5 Os métodos descritos no presente podem ademais incluir a fermentação do hidrolisado enzimático líquido para gerar um bioproduto.

Os produtos com base biológica são produzidos pelos métodos descritos no presente. Por exemplo, o produto com base biológica gerado pelos métodos descritos no presente pode ser um biocombustível, hidrocarboneto ou um produto bioquímico.

Outro aspecto da invenção é um bioproduto produzido de acordo com os métodos descritos no presente. Tal bioproduto é selecionado a partir do grupo que consiste de um químico com base biológica, hidrocarboneto, produto bioquímico ou a biocombustível.

15 Outro aspecto da invenção é uma instalação de produção de biocombustível que inclui: uma unidade de produção de bioproduto configurada para produzir um bioproduto e um subproduto que contém nutrientes a partir de biomassa pré-tratada com amônia; e uma unidade de produção de enzima em comunicação com a unidade de produção de bioproduto e configurada para produzir uma enzima a partir do subproduto que contém nutriente e o solúvel extraído a partir da biomassa pré-tratada para uso na unidade de produção de bioproduto.

A instalação de produção de biocombustível produz um bioproduto tal como um biocombustível, hidrocarboneto, bioquímico ou uma combinação destes. Em algumas realizações, o biocombustível é um álcool (por exemplo, etanol). A biomassa pré-tratada com amônia usada na instalação de produção de biocombustível pode ser palha de milho pré-tratada com amônia.

Outro aspecto da invenção é um método de produção de um bioproduto que compreende: produzir uma enzima em uma unidade de produção de enzima que compreende um microorganismo que produz enzima, um resíduo de produção de etanol, e um estimulante extraído a partir de uma biomassa pré-tratada com amônia; e fornecer a enzima a uma unidade de produção de bioproduto em que o bioproduto é produzido. Por exemplo, a biomassa pré-tratada com amônia a partir da qual o estimulante é extraído pode ser palha de milho tratada com amônia. Em algumas realizações, o resíduo de produção de etanol é licor de xarope de milho. O resíduo de produção de etanol pode ser, por exemplo, um bioproduto que contém nutriente gerado na unidade de produção de bioproduto. Além disso, a unidade de produção de enzima pode incluir uma biomassa pré-tratada diluída. O bioproduto produzido no método pode ser um bioquímico ou um biocombustível (por exemplo, um álcool).

O estimulante extraído a partir de uma biomassa pré-tratada com amônia pode incluir solúveis capazes de estimular cultivo microbiano. O estimulante pode também conter solúveis capazes de estimular ou induzir a produção de enzima no microorganismo que produz enzima. A enzima produzida pode ser, por exemplo, uma enzima sacarolítica. Por exemplo, a enzima sacarolítica pode ser selecionada a partir de exoglucanases, endoglucanases, β -xilosidases, endoxilanas, α -arabinofuranosidases, proteína induzida de celulose 2, α -arabinofuranosidases, acetil xilana esterases, α -glucuronidasas, endoxilanas, poligalaturonases, α -galactosidases, acetil esterases e combinações destes.

O microorganismo que produz enzima na unidade de produção de enzima pode ser selecionado a partir de *Trichoderma reesei* e *A. Awamori*.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIGURA 1A é um fluxograma de processo de uma instalação

de produção de bioproduto integrada de acordo com várias realizações.

A FIGURA 1B é um fluxograma de processo de uma porção da instalação de produção de bioproduto integrada da FIGURA 1A de acordo com várias realizações.

5 A FIGURA 2A é um gráfico que mostra o efeito de temperatura de extração em rendimentos de solubilização de biomassa e proteína para *switchgrass* tratada com Explosão de Fibra por Amônia (Amônia Fiber Explosion - AFEX) (AFEX-SG) de acordo com várias realizações.

10 A FIGURA 2B é um gráfico que mostra o efeito de concentração de amônia sobre rendimentos de biomassa e proteína para AFEX-SG de acordo com várias realizações.

A FIGURA 3A é um gráfico que mostra o efeito de pH de extração em rendimentos de biomassa e proteína para AFEX-SG de acordo com várias realizações.

15 A FIGURA 3B é um gráfico que mostra o efeito de agentes de redução em rendimentos de solubilização de proteína para *switchgrass* não tratada e AFEX-SG de acordo com várias realizações.

20 A FIGURA 4 é um gráfico que mostra perfis de aminoácido para proteínas de *switchgrass* não tratada, proteínas de AFEX-SG e proteínas de *switchgrass* nativa de acordo com várias realizações.

A FIGURA 5 é um fluxograma de processo para tratamento por AFEX com extração anterior a hidrólise de acordo com várias realizações.

A FIGURA 6 é um fluxograma de processo para tratamento por AFEX com extração após a hidrólise de acordo com várias realizações.

25 A FIGURA 7 mostra a entrada de componentes exemplificativos a e resultantes de hidrólise enzimática de sólidos de carga de celulose a 6% de acordo com várias realizações.

A FIGURA 8 mostra um balanço de massa exemplificativo para o

processo mostrado na FIGURA 8, que inclui um balanço de massa para entrada de componentes em e saída de um processo de tratamento por AFEX de acordo com várias realizações.

A FIGURA 9A é um gráfico que mostra o consumo de glicose na fermentação de extrato de água de Equivalente de Carga de Sólidos a 9% (SLE) a partir de palha de trigo tratada por AFEX (AFEX-CS) e palha de arroz tratada por AFEX (AFEX-RS) de acordo com várias realizações.

A FIGURA 9B é um gráfico que mostra a densidade de célula na fermentação de extrato de água de CLE a 9% CLE a partir de AFEX-CS e AFEX-RS de acordo com várias realizações.

A FIGURA 9C é uma representação esquemática de fermentação de etanol em dois estágios e geração de co-produto de *S. cerevisiae* nativo de acordo com várias realizações.

A FIGURA 9D é uma representação esquemática de reciclagem de célula de *S. cerevisiae* recombinante para fermentação de xilose de alta densidade de célula de acordo com várias realizações.

A FIGURA 10A é um gráfico que mostra perfis de açúcar e etanol para fermentação em dois estágios de acordo com várias realizações.

A FIGURA 10B é um gráfico que mostra o consumo de xilose por *S. cerevisiae* recombinante 424A (LNH-ST) por três gerações de reciclagem de acordo com várias realizações.

A FIGURA 11A é uma ilustração esquemática de produção de enzima com uso de fermentação de *T. reesei* RUT-C30 de acordo com várias realizações.

A FIGURA 11B é um gráfico que compara a atividade relativa de enzimas induzidas com uso de AFEX-CS e lactose de acordo com várias realizações.

A FIGURA 11C é um gráfico que mostra rendimento de açúcar

líquido de hidrólise enzimática em AFEX-CS de carga de celulose a 1% com uso de caldo de RUT-C30 diluído a 1:6 induzido por mistura de AFEX-CS de acordo com várias realizações.

5 A FIGURA 11D é um gráfico que mostra as 11 celulasas e hemicelulasas mais secretadas de *T. reesei* (RUT-C30) diferencialmente expressas durante a indução com uso de extrato de água ("WE") de AFEX-CS, biomassa sólida de AFEX-CS + seu extrato de água ("AFCS + WE") e lactose de acordo com várias realizações.

10 A FIGURA 12A é um gráfico que mostra concentrações de açúcares monoméricos e etanol durante o tempo para hidrolisado de AFEX-CS fermentado com uso de *T. saccharolyticum* ALK2 de acordo com várias realizações.

15 A FIGURA 12B é um gráfico que mostra açúcar concentrações para vários açúcares monoméricos e oligoméricos durante o tempo para hidrolisado de AFEX-CS fermentado com uso de *T. saccharolyticum* ALK2 de acordo com várias realizações.

A FIGURA 13 é um fluxograma de processo de uma seção de conversão biológica de um biorefinaria com produção de enzima interna e co-produção de levedura de acordo com uma realização.

20 A FIGURA 14A é um gráfico de barras que mostra o custo e discriminação de receita para um esquema integrado de modelo conforme comparado com um esquema convencional de modelo de acordo com uma realização.

25 A FIGURA 14B é um gráfico de barras que mostra custos e receitas de quatro tipos de esquemas integrados de acordo com várias realizações.

A FIGURA 14C é um gráfico de barras que mostra o impacto econômico de vários esquemas integrados de acordo com várias realizações.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Na seguinte descrição detalhada das realizações preferenciais, é feita referência aos desenhos anexos, que formam parte deste e em que é mostrado por meio de ilustração realizações preferenciais específicas em que a invenção pode ser praticada. Essas realizações são descritas em detalhe suficiente para permitir que aqueles versados na técnica pratiquem a invenção e deve-se entender que outras realizações podem ser utilizadas e que mudanças químicas, de procedimento e outras podem ser feitas sem afastamento do espírito e escopo da presente invenção. A seguinte descrição detalhada, então, não deve ser tomada em um sentido limitante e o escopo da presente invenção é definido somente pelas reivindicações anexas, juntamente com o escopo completo de equivalentes aos quais tais reivindicações são conferidas.

A Descrição Detalhada que segue começa com uma seção de definição seguida por uma breve visão geral de tecnologias atuais para produção de produtos comerciais a partir de biomassa com base em celulose, uma descrição das realizações, uma seção de exemplo e uma breve conclusão.

DEFINIÇÕES

O termo “biomassa” conforme usado no presente, se refere em geral a matéria orgânica colhida ou coletada a partir de um recurso biológico renovável como uma fonte de energia. O recurso biológico renovável pode incluir materiais de planta, materiais de animal e/ou materiais produzidos biologicamente. Não se consideram incluídos no termo “biomassa” os combustíveis fósseis, que não são renováveis.

O termo “biomassa de planta” ou “biomassa lignocelulósica” ou “biomassa celulósica” conforme usado no presente, pretende se referir a virtualmente qualquer matéria orgânica derivada de planta (de maneira ou de

não madeira) disponível para energia em uma base sustentável. A biomassa de planta pode incluir, mas não se limita a, descartes e resíduos de colheita agrícola tais como palha de milho, palha de trigo, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e similares. A biomassa de planta ademais inclui, mas não se limita a, colheitas de energia de maneira, descartes e resíduos de madeira e tais como árvores, incluindo árvores frutíferas, tais como árvores que produzem frutas, (por exemplo, macieiras, laranjeiras e similares), desbastes florestais de madeira mole, descartes de cortiça, pó-de-serra, fluxos de descarte de indústria de papel e polpa, fibra de madeira e similares. Adicionalmente, colheitas de grama, tais como várias gramas de pradaria, incluindo tipos de grama de pradaria, *switchgrass*, *miscanthus*, *big bluestem*, *little bluestem*, grama de aveias laterais e similares, têm potencial para serem produzidos em larga escala como fontes de biomassa de planta adicionais. Para áreas urbanas, a matéria-prima de biomassa de planta potencial inclui descarte de jardim (por exemplo, cortes de grama, folhas, cortes de árvore, arbusto, etc.) e descarte de processamento de vegetal. A biomassa de planta é conhecida por ser a forma mais predominante de carboidrato disponível na natureza e a palha de milho é atualmente a maior fonte de biomassa de planta facilmente disponível nos Estados Unidos.

O termo “biocombustível” conforme usado no presente, se refere a qualquer combustível sólido, líquido ou gasoso produzido biologicamente, por exemplo, aqueles derivados de biomassa. A maioria dos biocombustíveis é originariamente derivada de processos biológicos tais como o processo de fotossíntese e pode assim ser considerada uma fonte de energia química ou solar. Outros biocombustíveis, tais como polímeros naturais (por exemplo, quitina ou certas fontes de celulose microbiana), não são sintetizados durante a fotossíntese, mas podem ser, contudo, considerados um biocombustível porque são biodegradáveis. São de forma geral considerados serem três os

tipos de biocombustíveis derivados de biomassa sintetizada durante a fotossíntese, ou seja, biocombustíveis agrícolas (definidos a seguir), biocombustíveis de descarte municipal (lixo ou restos residenciais e comerciais de luz, com a maioria dos materiais recicláveis tais como vidro e metal removidos) e biocombustíveis florestais (por exemplo, árvores, correntes de subproduto e descarte de produtos de madeira, fibra de madeira e indústrias de papel e polpa). Os biocombustíveis produzidos a partir de biomassa não sintetizados durante a fotossíntese incluem, mas não se limitam a, aqueles derivados de quitina, que é uma forma quimicamente modificada de celulose conhecida como um polímero de glucosamina de N-acetil. A quitina é um componente significativo do descarte produzido pela indústria da agricultura porque compreende as conchas de fruto do mar.

O termo “biocombustível agrícola”, conforme usado no presente, se refere a um biocombustível derivado de colheitas agrícolas (por exemplo, grãos, tais como milho), resíduos de colheita, descartes de instalação de processamento de grão (por exemplo, cascas de trigo/aveia, milho/feijão finos, materiais sem especificação, etc.), descarte de instalação de produção pecuária (por exemplo, adubo, carcasses, etc.), descarte de instalação de processamento pecuário (por exemplo, partes indesejáveis, fluidos de limpeza, materiais contaminados, etc.), descarte de instalação de processamento de alimento (por exemplo, fluido de descarte separado tal como graxa, gordura, vapores, conchas, resíduos de processo intermediário, fluidos de lavagem/limpeza, etc.), subprodutos de instalação agrícola de adição de valor (por exemplo, grão molhado por destilador (DWG) e xarope de instalações de produção de etanol, etc.), e similares. Exemplos de indústrias pecuárias incluem, mas não se limitam a, instalações de carne bovina, suína, de peru, de frango, de ovos e de laticínios. Exemplos de colheitas agrícolas incluem, mas não se limitam a, qualquer tipo de planta que não formam madeira (por

exemplo, algodão), grãos tais como milho, trigo, soja, sorgo, cevada, aveias, centeio, e similares, ervas (por exemplo, amendoim), colheitas de herbáceas de curta rotação tais como *switchgrass*, alfalfa, e assim por diante.

O termo “etapa de pré-tratamento” conforme usado no presente, se refere a qualquer etapa que pretenda alterar biomassa nativa de forma que esta possa ser mais eficientemente e economicamente convertida a compostos químicos intermediários reativos tais como açúcares, ácidos orgânicos, etc., que podem então ser ademais processados uma variedade de produtos de valor agregado como um químico de valor agregado, tal como etanol. O pré-tratamento pode influenciar no grau de cristalinidade de um substrato polimérico, reduzis a interferência de lignina com a conversão da biomassa e pré-hidrólise de algumas dos carboidratos estruturais, assim aumentando sua digestibilidade enzimática e acelerando a degradação de biomassa para produtos úteis. Os métodos de pré-tratamento pode utilizar ácidos de concentrações variadas (incluindo ácido sulfúrico, ácidos clorídricos, ácidos orgânicos, etc.) e/ou outros componentes tais como amônia, hidróxido de amônia, cal, e similares. Os métodos de pré-tratamento podem adicionalmente ou alternativamente utilizar tratamentos hidrotérmicos incluindo água, calor, vapor ou vapor pressurizado. O pré-tratamento pode ocorrer ou estar localizado em vários tipos de recipientes, reatores, tubos, fluxo através de células e similares. A maioria dos métodos de pré-tratamento provocará a solubilização e/ou desestabilização parcial ou completa de lignina e/ou hidrólise de hemicelulose a monômeros ou oligômeros de açúcar pentose.

O termo “teor de umidade” conforme usado no presente, se refere à umidade percentual de biomassa. O teor de umidade é calculado como gramas de água por grama de biomassa molhada (matéria seca de biomassa mais água) vezes 100%.

O termo pré-tratamento por “Explosão de Fibra por Amônia” ou

“Expansão de Fibra por Amônia” (doravante “AFEX”) conforme usado no presente, se refere a um processo para pré-tratar a biomassa com amônia para solubilizar a lignina/hemicelulose e redepositar esta entre as paredes da célula da planta para as superfícies externas de parede da célula da planta da biomassa. Em algumas realizações a amônia empregada é amônia líquida anidra. Em algumas realizações a biomassa usada para pré-tratamento por AFEX tem umidade reduzida. Um pré-tratamento por AFEX rompe a matriz lignocelulósica, modificando assim a estrutura da lignina, hidrolisando parcialmente a hemicelulose e aumentando a acessibilidade de celulose e a hemicelulose remanescente a subsequente degradação enzimática. A lignina é o impedimento primário a hidrólise enzimática de biomassa nativa, e a remoção ou transformação da lignina é um mecanismo suspeito de diversas das tecnologias de pré-tratamento principais, incluindo AFEX. No entanto, ao contrário de muitos outros pré-tratamentos, as temperaturas inferiores e condições não ácidas do processo de AFEX impedem que a lignina e/ou hemicelulose sejam convertidas em furfural, hidroximetil furfural, fenólicos e ácidos orgânicos que poderia afetar negativamente a atividade enzimática/microbiana. O processo ademais expande e incha as fibras de celulose e ademais quebra hemicelulose amorfa em biomassa lignocelulósica. Essas mudanças estruturais abrem a estrutura da parece celular permitindo a conversão mais eficiente e completa da biomassa lignocelulósica a produtos de valor agregado enquanto preserva o valor nutriente e composição do material. Vide, por exemplo, os métodos descritos nas Patentes N° US 6.106.888, US 7187.176, US 5.037.663, e US 4.600.590, todas as quais são incorporadas ao presente a título de referência em sua totalidade conforme estabelecido de forma completa adiante no presente.

O termo “bioproduto” conforme no presente se refere a produtos obtidos a partir de hidrólise e/ou fermentação enzimática de biomassa pré-

tratada. Exemplos de bioprodutos incluem biocombustíveis (por exemplo, uma ou mais álcoois, incluindo etanol), hidrocarbonetos e produtos bioquímicos (por exemplo, ácidos orgânicos, tais como ácido láctico ou ácido succínico) produzidos a partir de biomassa pré-tratada.

5 O termo “unidade de produção de bioproduto” conforme usado no presente se refere aquela porção de um processo de produção de bioproduto em uma instalação de produção de bioproduto em que a biomassa lignocelulósica pré-tratada é processada e convertida no bioproduto.

O termo “instalação de produção de bioproduto integrada”
10 conforme usado no presente se refere a uma instalação de produção de bioproduto para produzir um bioproduto e a subproduto que contém nutriente a partir de biomassa lignocelulósica pré-tratada e para ademais usar solúveis extraídos da biomassa lignocelulósica pré-tratada para ao menos um dos seguintes dois propósitos: (1) promover ou induzir a produção de enzima por
15 microorganismos, e/ou (2) estimular o cultivo por fermentação e/ou microorganismo que produz enzima. Uma “instalação de produção de biocombustível integrada” produz um biocombustível da maneira integrada descrita anteriormente e pode também ser referida como uma “biorefinaria integrada”.

20 O termo “subproduto que contém nutriente” conforme usado no presente se refere a um subproduto produzido a partir da produção de bioproduto a partir de biomassa lignocelulósica. O subproduto que contém nutriente pode incluir componentes precursores de alimento. Licor de Lavagem de Milho (CSL) é um exemplo de um subproduto que contém nutriente.

25 O termo “hidrolisado de biomassa pré-tratada diluído” conforme usado no presente se refere a um hidrolisado de biomassa pré-tratada de planta que contém não menos que cerca de 3% de umidade. O hidrolisado de biomassa pré-tratada diluído pode ser um hidrolisado diluído de biomassa pré-

tratada com amônia.

O termo “Licor de Lavagem de Milho” conforme usado no presente se refere a um subproduto que contém nutriente de moagem a molhado de milho. O CSL é uma mistura de proteína solúvel, aminoácidos, 5 carboidratos, ácidos orgânicos (por exemplo, ácido láctico), vitaminas e minerais.

O termo “solúveis” conforme usado no presente se refere a componentes extraídos a partir de biomassa pré-tratada com uso de um solvente apropriado. Os solúveis podem incluir ao menos um “estimulante” que 10 é um estimulante de cultivo microbiana e/ou um agente que induz a produção de enzima a partir de um micróbio. A biomassa pode ser uma biomassa lignocelulósica. O solvente empregado é tipicamente aquoso. Em algumas realizações, quando a água é usada como solvente, esta pode conter um agente alcalino (por exemplo, hidróxido de amônia).

15 CONVERSÃO DE BIOMASSA EM PRODUTOS COMERCIAIS

Quase todas as formas de biomassa lignocelulósica, isto é, biomassa de planta, tais como monocotiledôneas, compreendem três frações químicas primárias: hemicelulose, celulose e lignina. A hemicelulose é um polímero de cadeias altamente ramificadas, curtas geralmente de açúcares de 20 cinco carbonos (xilose e arabinose), e a uma menor extensão de açúcares de hexose de seis carbonos (galactose, glicose e manose). Dicotiledôneas, por outro lado, têm um alto teor de pectato e/ou pectina, que é um polímero de ácido glucurônico alfa-vinculado. O pectato pode ser “decorado” com açúcares manose ou ramnose, também. Esses açúcares são altamente substituídos por 25 ácido acético.

Por causa de sua estrutura ramificada, a hemicelulose é amorfa e relativamente fácil de hidrolisar (quebra ou clivagem) a seus açúcares constituintes individuais por enzima ou tratamento de ácido diluído. A celulose

é um polímero linear de açúcares glicose, muito similar ao amido, que é o substrato primário de grão de milho em grão seco e plantas de etanol moídas a molhadas.

No entanto, diferentemente do amido, os açúcares glicose de
5 celulose são unidos juntamente por ligações β -glicosídicas que permitem que a celulose forme cadeias lineares associadas proximamente. Por causa do alto grau de ligação de hidrogênio que pode ocorrer entre cadeias de celulose, a celulose forma uma estrutura cristalina rígida que é altamente estável e muito mais resistente à hidrólise por ataque químico ou enzimático que o amido ou
10 polímeros de hemicelulose. A lignina, que é um polímero de moléculas fenólicas, fornece integridade estrutural a plantas e permanece como material residual após os açúcares em biomassa de planta terem sido fermentados em etanol. A lignina é um subproduto de produção de álcool e é considerado um combustível sólido de qualidade prêmio por causa de seu teor zero de enxofre
15 e valor de aquecimento, que é próximo aquele de carvão sub-betuminoso.

Faixas típicas de hemicelulose, celulose e concentrações de lignina em plantas estão disponíveis no website www1.eere.energia.gov/biomassa/feedstock_databases.html. Tipicamente, a celulose forma de 30 a 50% de resíduos de fontes agrícolas, municipais e
20 florestais. A celulose é mais difícil de hidrolisar que a hemicelulose, mas, uma vez hidrolisada, se converte mais eficientemente em etanol com fermentação de glicose que a hemicelulose. Em oposição, os polímeros de açúcar de hemicelulose são relativamente fáceis de hidrolisar, mas não se convertem tão eficientemente como a celulose com uso de linhagens padrão de fermentação
25 (que produz etanol a partir de glicose). Embora os açúcares hemicelulose representem “ao alcance da mão” para conversão a etanol, o teor substancialmente mais alto de celulose representa o grande potencial para maximizar os rendimentos de álcool, tais como etanol, sobre uma base por

tonelada de biomassa de planta.

Os métodos convencionais para converter a biomassa em álcool incluem processos que empregam um pré-tratamento de hidrólise de ácido concentrado, um pré-tratamento de hidrólise de ácido em dois estágios assim
5 como processos que empregam qualquer pré-tratamento convencional conhecido, tal como pré-tratamentos hidrotérmicos ou químicos, seguido por uma hidrólise enzimática (isto é, hidrólise catalisada por enzima) ou simultaneamente hidrólise enzimática e sacarificação. Tais métodos de pré-tratamento podem incluir, mas não se limitam a, hidrólise de ácido diluído,
10 métodos baseados em água quente a alta pressão, isto é, tratamentos hidrotérmicos tais como explosão de vapor e extração de água quente aquosa, sistemas reatores (por exemplo, lote, fluxo contínuo, fluxo por contador, fluxo de atravessamento e similares), AFEX, percolação reciclada de amônia (ARP), tratamento de cal e um tratamento baseado em pH. No entanto, pré-
15 tratamento-hidrólise de biomassa de planta pode às vezes resultar na criação e liberação de outros químicos que inibem a fermentação microbiana. Esses inibidores (isto é, furfural) são amplamente o produto de degradação de açúcar e métodos para remover esses inibidores ou reduzir sua formação ou linhagens resistentes aos inibidores são necessárias.

20 Diversos desses métodos geram hidrólise quase completa da fração de hemicelulose para eficientemente recuperar altos rendimentos dos açúcares pentose solúveis. No entanto, solubilizações químicas de hemicelulose também produzem produtos tóxicos, tais como derivados de furano, que podem inibir reações microbiais à jusante (por exemplo,
25 fermentação). Apesar disso, a hidrólise de hemicelulose facilita a remoção física da hemicelulose e lignina ao redor, assim expondo a celulose para posterior processamento. No entanto, a maioria, se não todas, as abordagens de pré-tratamento não hidrolisam significativamente a fração de celulose da

biomassa.

A conversão de biomassa em álcool também pressupõe considerações de fermentação única. As linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* usadas em plantas de etanol convencionais, por exemplo, podem fermentar glicose, mas não podem fermentar açúcares pentose tais como xilose. Adicionalmente, não há atualmente nenhum microorganismo que ocorra naturalmente que possa efetivamente converter todos os principais açúcares presentes em biomassa de planta a etanol. Então, levedura ou bactéria geneticamente projetada, que podem, em teoria, fermentar tanto glicose como xilose a álcool, é usada como biomassa em processos de álcool. No entanto, na prática, a co-fermentação é ineficiente e a fermentação de glicose é ainda a reação principal para produção de etanol.

DESCRIÇÃO DAS REALIZAÇÕES

Em uma realização, uma instalação de produção de bioproduto integrada, tal como uma instalação de produção de biocombustível, é configurada para gerar biomassa lignocelulósica pré-tratada para formar tanto bioproduto como enzimas úteis para fazer bioprodutos. Em uma realização, esta abordagem integrada é utilizada para produzir etanol e a enzima utilizada na produção de etanol sem lavagem, desintoxicação ou adição suplementar (exógena) de nutrientes para a biomassa pré-tratada. Como tal, a biomassa lignocelulósica pré-tratada não serve apenas como uma fonte de carbono e nitrogênio, mas também fornece outros nutrientes para a instalação de produção de biocombustível. Em uma realização, o processo ademais inclui a produção de levedura. Em uma realização, a biomassa lignocelulósica é pré-tratada com amônia, tal como com um tratamento por Expansão de Fibra por Amônia (AFEX), para produzir materiais de planta reativos, altamente fermentáveis reduzindo a geração de produto de degradação inibitória e enriquecendo o teor de nitrogênio dos materiais pré-tratados.

A FIGURA 1A mostra uma realização de uma instalação de produção de biocombustível 100 que utiliza uma unidade de produção de bioproduto (BPU) 102 para produzir um bioproduto 15. Na realização mostrada na FIGURA 1A, a biomassa 1 é fornecida a uma unidade de pré-tratamento 104 que pré-trata a biomassa 1 para produzir biomassa pré-tratada 2. Em uma realização, a unidade de pré-tratamento 104 é uma unidade de tratamento por AFEX. Uma porção da biomassa pré-tratada 2 é fornecida a uma unidade de extração 106 para extrair solúveis da biomassa pré-tratada 2 com uso de um solvente adequado (por exemplo, água), enquanto o remanescente da biomassa pré-tratada 2 é fornecido à BPU 102. Em uma realização, entre cerca de 20% e cerca de 40% da biomassa pré-tratada 2 é fornecido à unidade de extração de água 106. Em uma realização, cerca de 30% a cerca de 35% é fornecido à unidade de extração de água 106.

Em uma realização, a biomassa 1 é biomassa lignocelulósica (por exemplo, palha de milho não tratada). Em uma realização, a biomassa é derivada de uma ou mais plantas. Ao menos uma da uma ou mais plantas pode ser uma monocotiledônea. A monocotiledônea pode incluir, mas não se limita a, palha de milho, grama, palha de milho, sorgo, bagaço de cana-de-açúcar, trigo, arroz, milho ou uma combinação destes. A grama pode incluir, mas não se limita a, *switchgrass*, *miscanthus*, grama junco-de-canário ou uma combinação destes.

Em uma realização, a biomassa pré-tratada 2 é palha de milho pré-tratada por AFEX (AFEX-CS). Conforme descrito anteriormente, a biomassa pré-tratada 2 pode ser submetida à extração dentro da unidade de extração 106. Em algumas realizações, uma porção da biomassa pré-tratada 2 é extraída. Em outras realizações, uma maior parte da biomassa pré-tratada 2 é extraída. Por exemplo, cerca de 5% a cerca de 70% da biomassa 2 pode ser extraída na unidade de extração. Em algumas realizações, cerca de 20% a

50% da biomassa 2 pode ser extraída na unidade de extração. Após a extração de ao menos uma porção a biomassa pré-tratada extraída 4 pode ser enviada à Unidade de produção de bioproduto (BPU) 102.

A Unidade de extração 106 extrai ao menos um Estimulante 5, que pode ser adicionado à Unidade de produção de enzima 108. Em uma realização, o Estimulante 5 é um extrato de água da biomassa pré-tratada 2.

A Unidade de produção de enzima 108 pode conter um microorganismo que pode secretar uma enzima sacarolítica. Em algumas realizações, o microorganismo que produz enzima é *Trichoderma reesei*. Em uma realização, o microorganismo que produz enzima é *A. Awamori*. Em algumas realizações, o microorganismo que produz enzima é uma combinação de microorganismos, um dos quais é *Trichoderma reesei*.

Em uma realização, o bioproduto 15 é um biocombustível, tal como um álcool e/ou um hidrocarboneto. Em uma realização, o bioproduto 15 é um bioquímico, tal como um ácido orgânico e ácido succínico; o subproduto que contém nutrientes 18 pode também ser CSL.

A biomassa pré-tratada 2 é extraída em uma unidade de extração 106 com um aditivo de extração 25 para produzir solúveis extraídos, isto é, um estimulante 5 (de cultivo microbiana e/ou de produção de enzima microbiana) e biomassa pré-tratada extraída 4. Quaisquer condições adequadas configuradas para extrair os solúveis podem ser usadas. Em uma realização, os solúveis são extraídos com água como o aditivo de extração 25. Em uma realização, os solúveis são extraídos sob condições alcalinas, tais como com um pH entre cerca de 7 e 12, tal com um pH entre cerca de 8 e 9. Em uma realização, os solúveis são extraídos com solução aquosa de hidróxido de amônia como o aditivo de extração 25. Em uma realização, entre cerca de 0,01 e cerca de 30% por peso de NH_4OH é usado.

A biomassa pré-tratada extraída 4 é fornecida à linha que contém

a biomassa pré-tratada 2; a partir daí, os componentes combinados (biomassa pré-tratada extraída 4 e biomassa pré-tratada 2) entram na BPU 102.

A biomassa pré-tratada extraída 4 pode ter qualquer teor de umidade adequado. Em uma realização, o teor de umidade não é maior que cerca de 95%. Em algumas realizações, o teor de umidade na biomassa pré-tratada extraída 4 é tão baixo quanto 3%. Em outras realizações, o teor de umidade na biomassa pré-tratada extraída 4 está na faixa de cerca de 5% a 75%, com faixas de cerca de 50% a 75% sendo bem comuns. A biomassa pré-tratada extraída 4 tem teor de carboidrato reduzido quando comparado à biomassa pré-tratada 2. Em uma realização, o teor de carboidrato na biomassa pré-tratada extraída 4 é reduzido por até cerca de 7% quando comparado à biomassa pré-tratada 2. Em algumas realizações, o teor de carboidrato é reduzido por ao menos 7% até cerca de 40%.

O estimulante 5 pode ter qualquer carga de sólidos adequada, isto é, qualquer quantidade adequada de matéria sólida pode estar presente. Em uma realização, uma carga de sólidos de até cerca de 18% é atingida. Em uma realização, a carga de sólidos pode ser mais alta, tal como até cerca de 50% de carga de sólidos. O estimulante 5 é então fornecido a uma unidade de produção de enzima 108 que é também fornecida com um subproduto que contém nutrientes (isto é, microorganismo que produz enzima) 18 que sai da unidade de produção de bioproduto 102. A enzima resultante 6 é então fornecida à instalação de produção de bioproduto 102 para uso na produção de bioproduto 15. Em uma realização, a enzima 6 é uma enzima sacarolítica de fermentação de *Trichoderma reesei* (*T. reesei*). Em uma realização, a enzima 6 é de *A. Awamori*.

O resíduo de sólidos úmidos 8 que sai da unidade de produção de bioproduto 102 é separado em uma unidade de separação entre sólidos e líquido 110 (opcionalmente, com água adicionada 17) para produzir um

hidrolisado diluído de biomassa pré-tratada 11 e um resíduo de sólidos 21 que contém menos umidade que o resíduo de sólidos úmidos 8. Em uma realização, a unidade de separação entre sólidos e líquido 110 compreende uma prensa helicoidal. O hidrolisado diluído de biomassa pré-tratada 11 pode ser fornecido a uma cultura de semente microbiana 112 e também à unidade de produção de enzima 108 para uso como uma fonte de açúcar para o subproduto que contém nutrientes 18 (isto é, microorganismo que produz enzima).

O microorganismo 13 produzido com a cultura de semente microbiana 112 é fornecido à BPU 102. Qualquer tipo adequado de microorganismo 13 pode ser usado e/ou produzido. Em uma realização, *S. cerevisiae* 424A recombinante e nativo novo (LNH-ST) é usado e/ou produzido. Qualquer quantidade adequada de microorganismo 13 pode ser usada e/ou produzida, com a quantidade variando dependendo de quando do microorganismo 13 é reciclado com um fluido de reciclagem de microorganismo 19 mostrado na FIGURA 1B e quanto existe no fluido de purga de microorganismo 20.

Conforme mostrado na FIGURA 1B, a BPU 102 compreende uma unidade de hidrólise enzimática 102 a qual a enzima 6 é fornecida juntamente com a biomassa pré-tratada 2 e a biomassa pré-tratada extraída 4. Após submissão a hidrólise enzimática 120, uma pasta de hidrolisado enzimático 7 é produzida a qual é fornecida a uma unidade de processamento mecânico 12, tal como um tipo adequado de prensa, para produzir os sólidos residuais 8 e o hidrolisado enzimático líquido 9. O hidrolisado enzimático líquido 9 é fornecido tanto fornecido à unidade de fermentação 124 na qual o microorganismo 13 é também fornecido, quanto a uma unidade de pré-incubação de microorganismo 128.

A porção do hidrolisado enzimático líquido 9 que entra na unidade

de fermentação 124 (juntamente com o microorganismo 13) produz um bioproduto que contém microorganismo 14 que pode opcionalmente ser fornecido a uma unidade de sedimentação 126 para produzir o bioproduto 15. Em realizações que incluem a unidade de sedimentação 126, microorganismos residuais 17 podem também sair da unidade de sedimentação 126. Quaisquer microorganismos residuais 17 são fornecidos a um tanque de microorganismo 21 onde a saída é dividida entre o fluido de reciclagem de microorganismo 19 e de purga de microorganismo 20. Quantidades variadas do microorganismo 17 podem ser purgadas, por exemplo, após cada evento de reciclagem. Por exemplo, cerca de 1% a 40% do microorganismo 17 pode ser purgado após cada evento de reciclagem. Em algumas realizações, cerca de 10% do microorganismo 17 pode ser purgado.

Adicionalmente, uma unidade de pré-incubação de células 128 é configurada para receber o fluido de reciclagem de microorganismo 19 a partir do tanque de microorganismo 21 assim como o hidrolisado enzimático líquido 9 que sai da unidade de processamento mecânico 122. A unidade de pré-incubação de células 128 pré-incuba o micróbio no fluido de reciclagem de microorganismo 19 para produzir um microorganismo reciclado incubado 16 que é fornecido à unidade de fermentação 124. Em uma realização, o micróbio é uma levedura, fungo e/ou bactéria.

Em uma realização, fornecida por propósitos exemplificativos somente, uma instalação de produção de bioproduto 102 pode operar conforme segue: Uma base de 1000 g de palha de milho não tratada, 1020 g de palha de milho pré-tratada por AFEX (AFEX-CS) é produzida. Aproximadamente 1/3 da AFEX-CS é lavada em 18% em peso de carga de sólidos para render estimulante extraído de água 5 que pode ser usado para produção/indução de enzima. As enzimas que podem ser induzidas incluem uma enzima sacarolítica a partir de *Trichoderma reesei*. Os açúcares solúveis nos sólidos

residuais prensados são demais diluídos para gerar um fluido de açúcar para preparações de cultura de semente para *Trichoderma reesei* RUT-C30 e *Saccharomyces cerevisiae*. Levando-se em conta os fluidos de carboidrato usados para preparação e indução de pré-cultura, 10% do carboidrato na palha de milho não tratada em entrada são usados para produção de enzima. A palha de milho pré-tratada por AFEX lavada, em que o carboidrato total é reduzido por 7%, é alimentada para o fluido de AFEX-CS pré-tratada, e o fluido combinado é hidrolisado por enzima (por exemplo, com uso de enzima(s) sacarolítica(s), algumas das quais podem ser de *Trichoderma reesei*). Após 10 quadro dias de hidrólise enzimática, a pasta de hidrolisado enzimático é separada para render um hidrolisado enzimático líquido e sólidos residuais úmidos por meios de processamento mecânico, tais como um prensa pneumática. O hidrolisado enzimático líquido contém açúcares que são fermentados a etanol com uso de fermentação de etanol em dois estágios. A 15 fermentação pode empregar *S. cerevisiae* 424A nativo novo e/ou recombinante (LNH-ST) (por exemplo, 0,05 g/L de *S. cerevisiae* nativo novo para fermentação de glicose e 1,0 g seco wt/L de *S. cerevisiae* 424A novo (LNH-ST) inóculo para fermentação de xilose). A levedura a partir de um fluido de reciclagem pode também ser adicionada ou empregada. Durante a 20 fermentação, células de levedura nativa podem ser produzidas a um rendimento de 20,8 g de células de levedura seca /1 kg de Palha de Milho não tratada. Cerca de 10% do *S. cerevisiae* 424A recombinante (LNH-ST) pode ser purgado após cada evento de reciclagem.

Em uma realização, o teor de nutriente (proteína, vitaminas e 25 oligoelementos) de um hidrolisado enzimático tratado por AFEX, tal como palha de milho tratada por AFEX (AFEX-CS), tem uma carga de sólidos de até cerca de 18% com ao menos 85% do carboidrato solubilizado. Em uma realização, um método para suportar ambas as produções de etanol e de enzima internas

com uso de AFEX-CS é fornecido. (Vide também o Exemplo 6, que fornece um modelo econômico para o processo exemplificativo).

Ao contrário da prática convencional, as realizações descritas no presente não precisam utilizar nutrientes adicionados para suportar o cultivo microbiano para fermentação. Em uma realização, os nutrientes presentes na biomassa, tais como biomassa celulósica, são solubilizados em um extrato líquido do hidrolisado gerado por pré-tratamento AFEX e usado para estimular o cultivo microbiano e/ou síntese de enzima. Em uma realização, a biomassa tratada por AFEX pode suportar as atividades de fermentação além da produção de etanol devido à presença de minerais em excesso.

Reduzindo-se ou eliminando-se o uso de nutrientes adicionados e enzimas, e, em algumas realizações, levedura, os processos descritos no presente são mais econômicos que os métodos convencionais.

Em uma realização, a produção interna de enzima reduz a necessidade de enzima exógena de 10 mg/g de biomassa a menos de não mais que cerca de 1 mg/g de biomassa. O custo total de enzima se reduziu primariamente devido à habilidade de utilizar açúcares (tanto monômeros quanto oligômeros) a partir de AFEX-CS para produção de enzima.

Surpreendentemente, extrativos solúveis em água isolados de biomassa pré-tratada, tal como biomassa lignocelulósica pré-tratada por AFEX fornecem um indutor potente para produção de celulasas e hemicelulasas. Aperfeiçoamentos adicionais a linhagens de fungo industriais para otimizar a utilização de biomassa lignocelulósica pré-tratada como a única fonte de carbono para produção de enzimas de degradação de biomassa pode reduzir amplamente o custo de biorefinarias celulósicas.

Em uma realização, o custo de enzima é ademais reduzido por reciclagem ao menos parcial das enzimas, tal como com contato de corrente contrária de hidrolisado de biomassa gasto com novo, sólidos não hidrolisados.

Reduzir a quantidade total de enzimas hidrolíticas (de 15 mg proteína/gm de palha) também reduz o custo de enzima. O uso de uma abordagem de produção interna de enzima toma vantagem da biomassa celulósica abundante como a fonte de carboidrato e minerais, assim eliminando a necessidade de substratos custosos tais como lactose ou soforose enquanto se atinge indução superior de enzima.

A concentração de enzima produzida por estimulação "interna" de produção de enzima é suficiente para suportar uma alta carga de sólidos (ao menos 18% em peso de carga de sólidos) com hidrólise enzimática em uma carga de enzima de 15 mg de proteína/g de palha de milho. Como tal, em várias realizações, e ao contrário dos métodos convencionais, a mistura de enzima não é ademais concentrada, nenhum estabilizador de proteína é adicionado e/ou nenhum conservante é adicionado.

Em uma realização, a fermentação de alta densidade de célula pode ser conduzida sem a necessidade de inóculo de célula nova significativa devido à alta reciclabilidade de células de levedura no hidrolisado. Assim, a levedura nativa do primeiro estágio de fermentação do etanol é um exemplo de um coproduto útil que pode ser reciclado no processo de fermentação ou vendido. Então, a abordagem de biorefinaria proposta cria um cenário em que os processos descritos no presente podem aprimorar a produção de estimulantes de cultivo, estimulantes de produção de enzima, alimento precursores e levedura para assim estimular o cultivo da indústria de biocombustíveis. Esses produtos podem ser reciclados novamente em uma etapa apropriada do processo (vide FIGURA 1A) ou vendido para gerar receita. Além das indústrias de alimento e alimentação animal, a levedura é útil para gerar produtos de especialidade que incluem invertase, beta-glucanas, fosfolipídios e ergosterol. Assim, as células de levedura são um produto valioso dos processos descritos no presente.

Em uma realização, a levedura nativa serve como um agente para capturar e concentrar os nutrientes de biomassa de planta enquanto simultaneamente produz etanol como combustível. No entanto, em algumas realizações uma separação entre sólido e líquido precede a fermentação para facilitar a separação de células de levedura do caldo. Tais bioconversões podem então ser completadas no modo de Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF), ao invés do modo de Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas (SSCF).

Em uma realização, o hidrolisado a partir da biomassa tratada por AFEX, tal como AFEX-CS, especialmente em alta carga de sólidos, é rico em nutrientes e altamente fermentável, contendo nível de nutriente similar a mosto de malte para produção de cerveja. Isto é em oposição a práticas convencionais que são baseadas na percepção de que um hidrolisado enzimático de biomassa deve ser precedido por desintoxicação e suplementação de nutriente para aumentar sua fermentabilidade geral. Esta percepção pode ser devido à natureza de pré-tratamento de ácido em que a desintoxicação (tal como sobre calagem) e/ou lavagem de materiais pré-tratados para remover compostos inibitórios produz uma deficiência de nutrientes na biomassa pré-tratada.

Em uma realização, uma instalação de produção de biocombustível é fornecida que compreende uma fermentação de álcool (por exemplo, etanol) integrada em dois estágios e uma fermentação de enzima sacarolítica com um microorganismo adequado (por exemplo, *Trichoderma reesei* RUT-C30) com uso de biomassa pré-tratada por AFEX (por exemplo, biomassa celulósica tal como palha de milho, *switchgrass*, palha de arroz e similares) como uma fonte para carboidrato e minerais.

As realizações da invenção serão ademais descritas por referência aos seguintes exemplos, que são oferecidos para ademais ilustrar as

várias realizações da presente invenção. Deve-se entender, no entanto, que muitas variações e modificações podem ser feitas contanto que de permanença dentro do escopo da presente invenção.

EXEMPLO 1

5 A praticidade de extrair proteínas a partir de *switchgrass* coletado na primavera enquanto simultaneamente se produzem açúcares através de hidrólise enzimática foi examinada. As condições para extração de sólido/líquido com uso de amônia aquosa foram otimizadas e comparadas a outros solventes. Os esquemas de fluxo de processo potencial foram
10 examinados com relação a seus rendimentos de açúcar e proteína antes de um balanço de material completo do processo final ter sido determinado. A solução após a remoção de algumas das proteínas e amônia é a MGS.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATÉRIA-PRIMA

15 A matéria-prima usada neste experimento foi Alamo *Switchgrass* (*Switchgrass* ou GS) obtido da Auburn University e coletado em 22 de Maio de 2005. O teor de umidade do material era de aproximadamente 9%. Todo o material foi triturado a menos que 2 mm antes do teste.

PRÉ-TRATAMENTO

20 O pré-tratamento por AFEX foi realizado em um reservatório de pressão de aço inoxidável de 300. A água foi misturada com o *switchgrass* para aumentar o teor de umidade para 80% de base de peso seco. Esferas de vidro foram adicionadas para minimizar o espaço vazio, assim reduzindo-se a quantidade de amônia no estado gasoso. A tampa foi fechada aparafusada e
25 uma carga de cilindro de amostra com 1 (+/-0.04) g de NH₃ por g de biomassa seca, que permitiu que a amônia fosse carregada dentro do reservatório. O reator foi aquecido com uso de um manto de aquecimento de 400W PARR e deixado para ficar a 100°C (+/- 1°C) por cinco minutos. A pressão foi

explosivamente elevada girando-se rapidamente a válvula de exaustão. As amostras tratadas foram removidas e foram colocadas em uma capela durante a noite para remover a amônia residual.

HIDRÓLISE

5 O procedimento de hidrólise enzimática foi baseado mediante o protocolo 2004 LAP-009 designado, *Chemical Analysis e Testing (CAT) Standard Procedures*, do National Renewable Energia Laboratory (NREL), que é incorporado a título de referência no presente em sua totalidade. As amostras foram hidrolisadas em balões de Erlenmeyer em 10% de carga sólida
10 tampada a pH 4,8 por tampão de citrato de 1M. A celulose Spezyme CP (Genencor; Palo Alto, Califórnia) foi carregada a 15 FPU/g de glucana (31 mg de proteína/g), e β -glucosidase (NOVOZYME 188; Bagsvaerd, Dinamarca) a 64 pNPGU/g de glucana. Todas as amostras foram incubadas a 50°C com 200 rpm de rotação. A concentração de açúcar após 168 horas foi determinada
15 com uso de um sistema de Cromatografia de Líquido de Alto Desempenho Waters (HPLC) equipado com uma coluna de análise de carboidrato Aminex HPX-87P da Bio-Rad (Richmond, Califórnia). A água HPLC desgaseificada com uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min foi usada como a fase móvel, enquanto a temperatura na coluna foi mantida constante a 85°C.

EXTRAÇÕES DE PROTEÍNA

20 A triagem por extração de proteína ideal foi realizado com uso de um Extrator de Solvente Acelerado ASE 200 Dionex (Sunnyvale, Califórnia). As extrações foram realizadas em duplicata, com uso de duas extrações separadas por amostra, a 50°C, com 3% de hidróxido de amônia, a pH = 10,5,
25 após um tratamento por AFEX com uso de uma razão líquido/sólido de 11:1. O uso de 1500 psi (~102 atm) para as extrações reduziu o tempo de permanência de cerca de 30 minutos abaixo para cerca de 3 minutos. Para experimentos que envolvem variação de pH, o ácido hidrocloreico foi usado para reduzir o pH.

O pH da solução foi medido após a extração ter sido completada. Uma vez que as condições de extração ideais foram obtidas, todas as demais extrações foram realizadas em balões por 30 minutos com uma razão de líquido/sólido de 10:1 enquanto continuamente mexido.

5 Devido à presença de nitrogênio amoniacal, durante tanto o pré-tratamento por AFEX quanto as extrações subsequentes, não foi possível usar os métodos de análise de nitrogênio padrão (os métodos Kjedahl ou Dumas) para medir o teor total de proteína. Ao invés disso, a concentração de proteína foi medida com uso de um kit de ensaio de colorimétrico de ácido bicromínico
10 Pierce (Rockford, Illinois) com uso de albumina de soro bovino (BSA) como um padrão. Para reduzir os efeitos de agentes de interferência, tais como sais de amônia, componentes de lignina e glicose, as proteínas foram primeiro precipitadas e resolubilizadas (20). 100 µL de deoxicolato de sódio a 0,15% foram adicionados a 100 µL de solução de proteína e deixados descansar por
15 15 minutos. 200 µL de solução de ácido tricloroacético a 15% foram adicionados e deixados descansar a 2°C durante a noite. A mistura foi centrifugada a 13.000 RPM por 10 minutos e a partícula resultante foi lavada com acetona. A partícula foi resolubilizada em uma solução de tampão que continha 0,1M Tris, 2,5M ureia e 4% de SDS. Concentrações conhecidas de
20 extratos de proteína foram usados para calibrar a recuperação de proteína deste método.

ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO

O peso e o teor de umidade da fração de sólido remanescente após cada etapa de processamento foram medidos para determinar o balanço
25 de massa no sistema. A composição de cada uma dessas frações foi determinada com base mediante o protocolo NREL's LAP 002. O teor de cinzas foi determinado por aquecimento de 1,5 g de biomassa a 575°C por 24 horas e medição da perda de peso. Os extrativos de água e etanol foram

removidos com uso de uma extração em soxhlet. Uma porção da biomassa extraída foi digerida em ácido sulfúrico concentrado (72%) em uma razão líquido: sólido de 10:1 a 30°C por uma hora. A solução foi diluída a 4% de sulfúrico e autoclavado a 120°C por uma hora e então analisado por componentes de açúcar com uso de uma coluna HPLC HPX-87H Aminex da Bio-Rad (Richmond, Califórnia) com uso de ácido sulfúrico como a fase móvel. A lignina insolúvel em ácido foi medida como o sólido remanescente após a hidrólise menos o teor de cinza no resíduo sólido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPOSIÇÃO

A composição de aproximadamente 80% da massa do *switchgrass* Alamo usado neste exemplo é mostrada na Tabela 1 abaixo. A massa remanescente é primariamente de componentes solúveis em água, tais como ácidos orgânicos secundários e lignina solúvel em ácido.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO INSOLÚVEL EM ÁCIDO (AI) DE SWITCHGRASS ALAMO

<u>(G/100G DE MATÉRIA SECA)</u>	
Componente	Valor %
Glucano	26,4
Xilano	16,4
Arabinano	3,5
Sucrose	3,4
Proteína	7,3
Lignina AI	10,8
Lipídios	7,3
Cinza	4,8
Total	79,9

Conforme a Tabela 1 mostra, a quantidade de proteína foi inferior

à reportada na literatura para outras linhagens de *switchgrass*. O *switchgrass* que foi cultivado como uma colheita de energia de biomassa e foi colhido antecipadamente na estação de cultivo poderia similarmente ter teores de proteína próximos a 10%, o que pode ser mais adequado para processamento integrado de proteína e açúcar. A quantidade de fibra presente foi também inferior quando comparada com *switchgrass* coletado um dia depois, o que parece sugerir que os rendimentos inferiores de açúcar poderiam também resultar do uso de um corte mais antecipado. No entanto, o *switchgrass* de corte antecipado é menos recalcitrante que aquele coletado no outono. Como tal, um teor inferior de celulose e hemicelulose pode não ser um fator significativo. A baixa quantidade de lignina pode implicar menos interferência com hidrólise, assim como poucos produtos de degradação danosos, que poderiam inibir a produção de açúcar ou de outra forma estarem presentes no produto de proteína. O teor de cinza foi mais alto quando comparado ao teor de cinza no *switchgrass* coletado mais tarde na estação, isto é, próximo a total maturidade da planta.

O perfil de aminoácido essencial para o *switchgrass* Alamo usado neste estudo juntamente com os valores da literatura para grão de milho e de soja (Parkinson et al., Aquaculture 186: 293-310 (1999)) é mostrado na Tabela 2 abaixo:

TABELA 2. PERFIL DE AMINOÁCIDO ESSENCIAL PARA SWITCHGRASS ALAMO (SG),

	<u>SOJA E MILHO</u>								
	Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Val
SG	2,1	1,8	3,7	5,6	7,4	0,6	9,1	4,9	6,1
Soja	7,5	2,6	4,9	7,7	6,1	1,6	5,1	4,3	5,1
Milho	2,9	1,6	4,3	16,2	1,6	2,3	5,9	3,1	4,4

Da esquerda para a direita na Tabela 2, os aminoácidos incluem: Arginina (Arg), Histidina (His), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Lisina (Lys),

Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Treonina (Thr) e Valina (Val). Conforme a Tabela 2 mostra, o *switchgrass* foi relativamente alto em lisina. Conforme o aminoácido essencial, a quantidade de lisina é normalmente o primeiro aminoácido limitante em dietas de ave. Valores altos para fenilalanina e valina
5 estão também presentes no *switchgrass*. Enquanto o *switchgrass* é inferior em quantidades de leucina, arginina e metionina, esses aminoácidos são relativamente abundantes em milho. Assim, uma dieta de proteína de milho-*switchgrass* poderia compensar essas deficiências e assim poderia fornecer uma alternativa a uma dieta de milho e soja.

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO

A FIGURA 2A mostra o efeito de temperatura de extração nos rendimentos gerais de proteína e massa para *switchgrass* tratado por AFEX, com barrar de erro representando os valores máximo e mínimo. Os rendimentos de proteína aumentaram significativamente de 25°C a 40°C, mas
15 aumentos adicionais na temperatura não resultaram em maiores aumentos no rendimento de proteína. É provável que a maioria, se não todas, das proteínas presentes no *switchgrass* estivessem em seu estado natural, com as condições de coleta e secagem utilizadas provavelmente tendo tido pouco ou nenhum impacto. Como tal, as temperaturas brandas provavelmente não desdobraram
20 as proteínas ou afetaram significativamente sua solubilidade.

A FIGURA 2B mostra o efeito da concentração de amônia sobre os rendimentos de proteína e massa para o *switchgrass* tratado por AFEX. O rendimento de proteína permaneceu constante conforme os níveis de NH_4^+ foram aumentados de cerca de 1% até cerca de 3% por volume, mas então
25 começou a cair. Isto foi mais provavelmente devido ao "salgamento" da proteína conforme o aumento da proteína em concentração de sal diminuiu a quantidade de água disponível para solubilizar a proteína. Não pareceu haver qualquer salgamento em efeito, provavelmente porque 1% por volume de

solução de sal era já uma concentração suficiente para solubilizar a proteína. Conforme FIGURA 2B mostra, a massa total solubilizada não foi afetada pela concentração de sal.

A FIGURA 3A mostra o efeito de pH sobre os rendimentos de proteína e massa, com a quantidade de proteína extraída aumentando drasticamente de um pH de 8 para 10,5, antes da estabilização. Como tal, este teste sugere que o pH do sistema pode ser um fator significativo na determinação de rendimentos de proteína. A maioria das proteínas tem um ponto isoelétrico ácido, o pH no qual a proteína não terá alteração líquida, e então, ser o menos solúvel em um meio polar. Assim, aumentar o pH deverá aumentar a solubilidade de proteína, conforme demonstrado no presente. Conforme a FIGURA 3A mostra, a solução mais alcalina também produziu uma queda significativa na massa total solubilizada. Como tal, com menos biomassa em solução, pode ser mais fácil purificar as proteínas. Em adição, qualquer biomassa perdida durante a extração provavelmente incluía hemicelulose, que pode ser hidrolisada formando açúcares para produção de etanol. Aumentos adicionais em pH poderiam ser realizados com uma base mais forte que amônia. No entanto, tal abordagem é provavelmente degradaria a proteína.

Foram feitas tentativas para aumentar os rendimentos através de adição de um surfactante noniônico, designado TWEEN 80, um surfactante não iônico, dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol, um agente de redução. A FIGURA 3B é um gráfico que mostra o efeito de agentes de redução sobre rendimentos de proteína para *switchgrass* não tratado (hidrolisado e sem tratamento por AFEX) e *switchgrass* tratado por AFEX (hidrolisado e tratamento AFEX), com barras de erro que representam os valores máximo e mínimo. Nenhum aumento significativo foi visto pela adição tanto do surfactante ou do agente de redução for para o *switchgrass* não

tratado. No entanto, a adição tanto de TWEEN 80 como de β -mercaptoetanol ao *switchgrass* tratado por AFEX de fato aumentou a remoção de proteína. Este resultado sugere que o processo de AFEX afeta as proteínas de alguma maneira. É possível que esse efeito possa ser através da criação de ligações enxofre-enxofre clivada por β -mercaptoetanol ou por proteínas desdobradas e sítios hidrofóbicos de exposição, que podem ser resolubilizados com surfactantes. A massa total do *switchgrass* solubilizada também aumentou com a adição dos surfactantes, mais provavelmente devido às interações entre os surfactantes e porções hidrofóbicas do *switchgrass*.

Para determinar se o pré-tratamento por AFEX afeta os tipos de proteínas recuperados, a composição de aminoácidos individuais foi determinada. A FIGURA 4 é um gráfico que mostra aminoácido perfis para proteína de *switchgrass* não tratado proteína, A proteína de *switchgrass* tratada por AFEX e a proteína de *switchgrass* nativa e o *switchgrass* nativo (não hidrolisado e sem tratamento por AFEX). Amos os *switchgrass* não tratado e tratado por AFEX foram extraídos nas condições de amônia ideais sem adição de surfactante ou agente de redução. Embora o perfil de aminoácido para as proteínas solubilizadas durante a extração comparado a proteína total no *switchgrass* nativo ter sido bem diferente, o perfil entre extrações a partir de grama não tratada e tratada por AFEX exibiu somente diferenças secundárias. Como tal, embora o AFEX de fato rompa a estrutura celular do *switchgrass*, o AFEX não parece liberar outras proteínas. Como tal, é provável que a estrutura da própria proteína possa afetar a recuperação de proteína, ao invés da estrutura da planta ser usada como a biomassa. Assim, as condições de extração ideais para o *switchgrass* foram de aproximadamente 3% de amônia aquosa a um pH de 10 e temperatura de 40 a 50°C. Os rendimentos totais de proteína foram de aproximadamente 40% por peso. No entanto, o AFEX não parece, ao menos com este estabelecimento particular de condições de teste,

aumentar significativamente os rendimentos de proteína.

EXEMPLO 2

Este Exemplo descreve a integração de açúcar e proteína recuperador por realização de extração imediatamente após o AFEX ou
5 realização de extração imediatamente após a hidrólise. A não ser que de outra forma notado, todas as percentagens são em uma base ponderam.

EXTRAÇÃO PRÉVIA À HIDRÓLISE

O balanço de massa geral para açúcar e proteína integrados com a extração prévia à hidrólise é mostrado na FIGURA 5. Os balanços a cerca do
10 teor de proteína e cinza são dados, assim como a massa total e a quantidade de glicose e xilose produzida. Os rendimentos finais foram 240 g de glicose, 85,4 g de xilose e 80,7 g de proteína por kg de biomassa seca. O açúcar recuperado foi aproximadamente 74% por peso de valores teóricos, o que indica que aprimoramentos adicionais na recuperação de açúcar podem ser
15 feitos. Aproximadamente 40% por peso da proteína foi encontrada no extrato e 60% por peso no hidrolisado, o que demonstra que a proteína deve ser recuperada de fluidos de caldo com o objetivo de ser econômico. A biomassa insolúvel foi lavada após a hidrólise para garantir que todos os componentes solúveis fossem recuperados. O processo de lavagem pode ter agido como
20 uma segunda extração para remover as proteínas remanescentes ligadas a porções insolúveis da biomassa. O rendimento total de proteína foi de aproximadamente 87% por peso do total, levando-se em conta tanto a proteína de *switchgrass* quanto as enzimas usadas na hidrólise. No entanto, nenhuma proteína insolúvel permaneceu na biomassa, assim sugerindo que a proteína
25 remanescente foi quebrada e perdida em algum ponto durante o processo.

Aproximadamente 40% por peso da biomassa foi solubilizado durante a etapa de extração inicial de proteína. A fração solúvel da biomassa após as proteínas terem sido removidas pode ser usada como um Estimulante

de Cultivo Microbiano (MGS). A proteína pode ser concentrada e removida através de ultrafiltração ou precipitação por calor, enquanto a solução remanescente pode ser submetida a processamento adicional para fornecer o MGS.

5 A maioria das cinzas foi removida da biomassa durante a primeira etapa de extração. A remoção da cinza resulta em um resíduo insolúvel final que pode ser queimado para fornecer calor e força para a instalação de produção de biocombustível. Neste teste, somente cerca de 3% por peso de cinza permaneceu. Como tal, a maioria das cinzas foi removível durante uma
10 etapa, que fornece um meio econômico para produzir um produto de baixo teor de cinza.

Durante todo este teste, aproximadamente 17% por peso do *switchgrass* permaneceu insolúvel. O resíduo é compreendido primariamente de fibra não hidrolisada e lignina insolúvel, com pouco a nenhuma proteína ou
15 cinza presente. Como tal, este produto poderia ser útil como uma fonte de calor e força na instalação de produção de biocombustível, assim reduzindo-se as necessidades de gás natural ou carvão. Adicionalmente, a falta de proteína e cinza poderia reduzir a presença de formação de NOx e formação de escória, respectivamente.

20 HIDRÓLISE PRÉVIA À EXTRAÇÃO

Um processo separado, com foco na realização de hidrólise prévia à extração, é mostrado na FIGURA 6, com as quantidades de reagentes e produtos. Os balanços a cerca do teor de proteína e cinza são dados, assim como massa total e a quantidade de glicose e xilose produzida. Aqui, os
25 rendimentos de açúcar foram levemente mais altos, com um total de 356 g comparado a 325 g por kg de biomassa com uso da abordagem anterior mostrada na FIGURA 5. Este resultado foi principalmente devido à conversão de xilano, o que indica que os oligômeros de xilano foram provavelmente

extraídos juntamente com a proteína durante a etapa inicial de extração no cenário anterior. No entanto, embora aproximadamente 60% por peso da proteína no *switchgrass* tenha sido solubilizado durante a hidrólise, muito pouco foi extraído posteriormente. Isto pode ser porque durante hidrólise, outros compostos foram produzidos que interferiram na análise colorimétrica, assim aumentando o erro envolvido. Este balanço de massa, no entanto, contou somente com os aminoácidos individuais ao invés de uma resposta colorimétrica, fornecendo assim uma representação mais dos níveis reais de proteína. As extrações subsequentes no resíduo final não liberaram mais que uma pequena fração das proteínas residuais, tornando improvável que tratamentos adicionais possam remover a proteína residual.

A quantidade de material insolúvel remanescente foi menor que a quantidade que ocorreu quando a extração foi realizada prévia à hidrólise (FIGURA 5). Apesar disso, uma quantidade dimensionável de proteína permaneceu. A proteína tem um teor de energia inferior à lignina e sua combustão gera NO_x. Assim, uma extração prévia à hidrólise rende rendimentos mais altos de força, com rendimentos de açúcar levemente inferiores.

EXEMPLO 3

Neste Exemplo, uma opção para integrar o açúcar e proteína recuperados foi estudada por extração prévia à realização de AFEX. No entanto, os rendimentos de açúcar foram muito inferiores que os testes descritos no Exemplo 2. Embora não desejando ser ligado por esta teoria proposta, é possível que extrair proteínas e outros materiais antes do AFEX altere os efeitos do pré-tratamento por AFEX. O AFEX também produz alguns ácidos orgânicos que podem inibir a hidrólise, e, novamente, embora não definido, é possível que uma extração prévia possa produzir mais desses ácidos inibitórios. Como tal, a lavagem do *switchgrass* após o tratamento por

AFEX aumentos os rendimentos de açúcar a aproximadamente o mesmo nível que a hidrólise sem qualquer extração prévia.

EXEMPLO 4

A palha de milho (CS) foi obtida do National Renewable Energia Laboratory (NREL). A CS continha 33,2% de celulose, 22,4% de xilano, 3,3% de arabinano e 2,3% de proteína conforme determinado pelo método de análise composicional do National Renewable Energia Laboratory (NREL) conforme descrito nos Procedimentos Analíticos Padrão do NREL; O Departamento de Energia Americano, 2008 e pelo método descrito em S.P.S. Chundawat, R. Vismeh, L. Sharma, J. Humpala, L. Sousa, C.K. Chambliss, A.D. Jones, V. Balan, B.E. Dale, *Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during amonia fiber expansion (AFEX) e dilute-acid based pretreatments*, Biores Technol, 101 (2010) 8429-8438.

A palha de arroz (RS) foi produzida de acordo com o método descrito em Zhong, C., Lau, M.W., Balan, V., Dale, B.E. & Yuan, Y.J. A otimização da hidrólise enzimática e fermentação de etanol a partir da palha de arroz tratada por AFEX. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 667-676 (2009). A RS continha 4,7% de celulose, 15,1% de xilano e 2,2% de arabinano, conforme determinado pela metodologia do NREL descrita anteriormente.

Tanto a CS como a RS foram sujeitas a um tratamento por AFEX de acordo com o método descrito anteriormente para produzir CS tratada por AFEX (AFEX-CS) e RS tratada por AFEX (AFEX-RS), respectivamente. O processo de tratamento por AFEX utilizado é também descrito em Zhong, C., Lau, M.W., Balan, V., Dale, B.E. & Yuan, Y.J. A otimização da hidrólise enzimática e fermentação de etanol a partir da palha de arroz tratada por AFEX. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 667-676 (2009) e M.W. Lau, B.E. Dale, *Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using Saccharomyces cerevisiae 424A(LNH-ST)*, Procedimentos da Academia

Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América, 106 (2009) 1368-1373.

Neste teste, os solúveis foram extraídos com uso de água e um extrato aquoso foi usado em um meio de cultivo para o fungo *T. reesei*, que produz enzima celulase.

5 **18% DE PREPARAÇÃO DE EXTRATO DE ÁGUA SLE**

A palha de milho pré-tratada por AFEX (AFEX-CS) foi lavada com água destilada a uma razão de 1 g de AFEX-CS seca para 4,6 g de água para produzir um extrato aquoso (18% de carga de sólidos equivalente). Em cada lote de lavagem, a água destilada foi pré-aquecida a
10 de 60 a 70°C e adicionada a 100 g (peso equivalente seco) de AFEX-CS. O teor de água da AFEX-CS úmida foi reduzido por prensa. A lavagem foi conduzida em três ciclos, isto é o extrato de água de um ciclo prévio de lavagem foi usado para o próximo ciclo de lavagem. No ciclo final de lavagem, o teor de umidade da AFEX-CS lavada foi reduzido a 77±3%. O
15 extrato de água da AFEX-CS foi usado para a fermentação. As etapas de preparação foram conforme descrito em Lau et al, Biotechnol. Biofuels 2:30 (2009). O açúcar total solubilizado foi calculado multiplicando-se o açúcar solúvel total no extrato de água com volume total do extrato de água de uma dada massa de AFEX-CS seca.

20 **20% EM PESO DE PREPARAÇÃO CSL**

FermGold™ Licor de Lavagem de Milho (CSL) (Lot: 154-07) da Cargill, Inc (Minneapolis, MN) foi usada como o suplemento de proteína para as fermentações. Para preparar 20% em peso de CSL, 200 g de FermGold™ CSL foram diluídos a um volume total de 1 litro com água destilada após o pH ter
25 sido ajustado a 5 com grau reagente KOH. Os sólidos insolúveis foram separados do líquido por centrifugação a 5,000 × g por 30 min. Os 20% em peso de CSL foram esterilizados por filtração (0,22µm) e usados para preparação de meios.

PREPARAÇÃO DE CULTURA DE SEMENTE

Meio: 2% em peso de licor de lavagem de milho +20 g/L de glicose + 50mM de tampão de fosfato (ajustado a pH 5,5); e condições de cultura: 30°C, agitação de 200rpm, tempo de incubação de 48 horas.

5 **FERMENTAÇÃO DE *TRICHODERMA***

Meio: 60% v/v de cultura de semente e 5,5% de carga de sólidos equivalente de fluido de lavagem de AFEX-CS + 0,5 g de AFEX-CS em 50mL de volume total; e condição de cultura: pH 5,5 (ajustado a cada 24 horas), 30°C, agitação de 200rpm, tempo de incubação de 96 horas.

10 **HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

Carga de sólidos: 1% de carga de celulose equivalente de AFEX-CS; mistura de hidrólise: 1:6 diluído de caldo de fermentação de *Trichoderma* com carga variável de *Accellerase*; e condição de hidrólise: pH 4,8, 50°C, agitação de 250rpm, tempo de incubação de 24 horas.

15 **ANÁLISE DE TEOR DE NUTRIENTE**

AMÔNIA

A amônia livre em hidrolisado de AFEX-CS foi analisada por ensaio enzimático (R-biopharm AG (Cat no: 11112732035, Darmstadt, Alemanha). A solução foi diluída a um nível apropriado para detecção de
20 ensaio. O nível de redução de NADH, que indica a concentração de amônia na solução, foi medido como a absorbância em comprimento de onda de 340 nm com uso de um espectrofotômetro. Uma solução de amônia padrão (experimento de controle) foi testada para garantir a exatidão dos resultados. Outros detalhes experimentais e explicação de química enzimática são dados
25 pelo fabricante.

PROTEÍNA

As análises para concentrações de aminoácido em hidrolisado de AFEX-CS foram conduzidas na Instalação de Estrutura Macromolecular MSU

com uso de um sistema de Cromatografia de Líquido de Alto Desempenho (HPLC) equipado com uma Nova Pak C18 (3.9mm×150mm; Waters). Os detalhes operacionais do sistema foram descritos em Bergman, T. Carlquist, M., Métodos em Análise de Microsequência de Proteína – Amino acid Analysis
5 *by High Performance Liquid Chromatography of Phenylthiocarbamyl Derivatives*, pp. 45-55 (1986) que é incorporado a título de referência no presente em sua totalidade. Os aminoácidos envolvidos na análise são Asparagina (Asp), Ácido Glutâmico (Glu), Serina (Ser), Glicina (Gly), Histidina (His), Teronina (Thr), Arginina (Arg), Alanina (Ala), Prolina (Pro), Treonina
10 (Thr), Valina (Val), Metionina (Met), Isoleucina (Ile), Lisina (Lys) e Fenilalanina (Phe).

DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA EM ENZIMAS COMPLEXAS

As concentrações de enzimas comerciais Accelerase 1000, Spezyme CP, Novozyme 188, Multifect Xilanase e Multifect Pectinase foram
15 determinadas através de análise do teor de nitrogênio do precipitado de proteína. Cada enzima complexa foi centrifugada (13.000 x g) por 5 min, e 0,20 mL de sobrenadante claro da enzima foi combinado com 0,25 mL de ácido tricloroacético a 100% w/v (TCA) e 0,80 mL de água destilada para precipitar a proteína na solução de enzima. Após 5 minutos de incubação a 4°C, a mistura
20 foi centrifugada a 13,000 x g por 5 min e o sobrenadante foi decantado. O precipitado foi lavado com 1.0 mL de acetona fria (4°C) duas vezes, cada lavagem foi seguida por centrifugação e decantação da acetona residual. O precipitado de proteína lavada foi colocado em um cadinho (um suporte de amostra para analisador de nitrogênio) e seco a vácuo.

25 O teor de nitrogênio dentro do precipitado foi determinado com uso de um Analisador de Nitrogênio Total SN Skalar Primacs (Breda, Holanda). O princípio por trás da análise de nitrogênio é baseado no método Dumas com uso de EDTA como o padrão. Teor de nitrogênio foi convertido em teor de

proteína multiplicando-se um fator de 6,25. Os erros representados são desvios padrão de experimentos duplicados. As concentrações de proteína das respectivas enzimas comerciais analisadas de acordo com este protocolo são apresentadas na Tabela 3.

5 **TABELA 3: CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS EM ENZIMAS**

<u>COMERCIAIS</u>		
	Nitrogênio Total	Proteína Equivalente
	mg/mL	
Accellerase 1000	8,5±0,1	53,1±0,6
Spezyme CP	13,4±1,1	83,5±6,8
Novozyme 188	10,6±0,1	66,3±0,7
Multifect Xylanase	5,0±0,3	31,0±1,7
Multifect Pectinase	8,3±0,0	51,9±0,2

AMINOÁCIDOS LIVRES

500 µL de cada uma das respectivas soluções foram filtrados (Millipore Centricon), 20µL do eluído filtrado foi derivatizado com AccQ Tag (Waters), 10% da amostra derivatizada total foi injetado no sistema HPLC.

PROTEÍNA AMINOÁCIDOS

As três soluções foram secar a vácuo (SpeedVac, Savant) e hidrolisadas com 6N HCl em fase de vapor a 100°C por 24 hrs. As amostras secas hidrolisadas foram solubilizadas em 100 µL de 20mM de HCl e 10µL da mistura foi derivatizada com AccQTag (Waters). 10% da mistura derivatizada foi injetada em uma Nova Pak C18 (3,9mm×150mm; Waters).

TEOR DE NITROGÊNIO TOTAL

Os teores de nitrogênio da CS não tratada seca, CS tratada por AFEX, resíduo sólido, solução de enzima e hidrolisado de AFEX-CS foram

determinados com uso de um analisador de Nitrogênio Total SN Skalar Primacs (Breda, Holanda). As amostras líquidas (1 mL) foram secas a 110°C durante a noite antes da análise. A análise de nitrogênio é baseada no método Dumas com uso de EDTA como o padrão. O teor de nitrogênio das amostras
5 foi calculado dividindo-se o teor de nitrogênio (g) dos materiais analisados por peso ou volume das amostras.

MINERAIS

Os oligoelementos foram medidos por espectrometria de massa de plasma acoplada indutivamente (ICP-MS) no Departamento MSU de
10 Ciências Geológicas.

AMOSTRAS LÍQUIDAS

Aproximadamente 1 mL de amostra líquida foi digerido em uma placa quente, sub-ebulição, em béqueres savillex de Teflon limpos por ácido com uso de 1,9 mL de ácido nítrico Optima e 0,1 mL de ácido fluorídrico livre
15 de metal de traço por 24 horas. Após a digestão 0,250 mL de 30% de peróxido de hidrogênio livre de metal de traço foi adicionado e a amostra evaporada até quase secar em uma placa quente. As amostras foram então trazidas até o volume final com 5 mL de ácido nítrico Optima 2%, a inspeção visual mostrou uma digestão completa de todas as amostras. Esta solução passou no ICP-MS
20 para análises de varredura de massa completa.

AMOSTRAS SÓLIDAS

Aproximadamente 100 mg de amostras sólidas foram adicionadas a 5 mL de ácido nítrico Optima em uma ampola Savillex de Teflon limpa por ácido e sonicadas por 60 minutos para homogeneizar a amostra. Então as
25 amostras foram digeridas, sub-ebulição, durante a noite em uma placa quente. Após aproximadamente 24 h, 0,1 mL de ácido fluorídrico livre de metal de traço e 1 mL de 30% de peróxido de hidrogênio livre de metal de traço foi adicionado e digerido por outras 24 horas. Finalmente, as amostras foram deixadas

evaporar até quase secarem e tomadas até um volume final de 5 mL com ácido nítrico Optima 2 %. Esta solução foi passada no ICP-MS para análises de varredura de massa completa.

ANÁLISE DE ELEMENTO PRINCIPAL

5 Os elementos principais analisados incluem as amostras de potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), fósforo (P) e sódio (Na) serem diluídas a 1:300 antes da análise. Para análise de oligoelementos: amostras de cromo (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), arsênico (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), molibdênio (Mo), urânio (U), manganês (Mn), zinco (Zn), selênio
10 (Se), bário (Ba) e ferro (Fe) foram passadas sem diluição.

VITAMINAS

Cinco vitaminas úteis para fermentações industriais foram analisadas com uso de um LC/MS/MS (Quattro Micro, Waters) com uso de uma coluna C-18 Symmetry Waters. A fase móvel foi rodada a 0,3 mL/min com um
15 gradiente de 1 mM de ácido perfluoro heptanóico e acetonitrila. Os espectros de massa foram adquiridos por 6 min com uso de ionização por eletrospray em modo de íon positivo. A tensão capilar, a tensão do extrator e tensão de lentes RF foram definidos em 3,17 kV, 4,00 V e 0,3 V, respectivamente. A temperatura de fonte e a temperatura de dessolvatação foram a 110°C e
20 350°C. O fluxo de gás de dessolvatação foi definido em 400L/hr. As energias de colisão e potenciais de cone de fonte foram otimizados para cada transição com uso do software Waters QuanOptimize. Os dados foram adquiridos com MassLynx 4.0 e processados com o software QuanLynx.

FERMENTAÇÃO EM EXTRATOS DE ÁGUA A PARTIR DE CS E RS

25 Os extratos de água de palha de milho por AFEX e palha de arroz por AFEX a 9% de Carga de sólidos Equivalente (SLE) foram preparados de acordo com o método descrito em Lau, M. W. et al., *The impacts of pretreatment on the fermentability of pretreated lignocelulosic biomass: a*

comparative evaluation between ammonia fiber expansion and dilute acid pretreatment, Biotechnol Biofuels, vol. 2, 30 pp, 2009 (Epub Data: 08 de Dezembro de 2009).

Glicose e tampão de fosfato (saís) foram adicionados no extrato de água a uma concentração final de 100 g/L e 0,1M, respectivamente. O pH do extrato de água foi ajustado a 5,5. A cultura de semente de *S. cerevisiae* 424A(LNH-ST) foi preparada por inoculação de estoque congelado para meio de Fosfato de Extrato de Levedura (YEP) (5 g/L de extrato de levedura + 10 g/L de triptona + 30 g/L de glicose + 20 g/L de xilose) e a cultura foi cultivada microaerobicamente a 30°C por cerca de 18hr. A cultura crescida foi usada para inocular os extratos de água em uma densidade de células inicial de 2,0 unidades a OD600nm. Os experimentos de controle em Fosfato de Extrato de Levedura (YEP) e Base de Nitrogênio de Levedura (YNB) foram conduzidos em paralelo. Essas fermentações foram conduzidas em triplicata em 10 mL de volume de trabalho em 15 mL de ampolas de tampa rosqueada. As amostras foram tomadas em períodos designados.

FERMENTAÇÃO DE ETANOL EM DOIS ESTÁGIOS

Os estoques de glicerol congelado de *S. cerevisiae* nativo (ATCC 4124) foram inoculados em meio de Licor de Lavagem de Milho (CSL) 2% em peso, suplementados com 20 g/L de glicose e cultivados por 18hr. A cultura de semente cultivada foi usada como inóculo para um primeiro de estágio fermentação no hidrolisado enzimático de AFEX-CS de carga de glucano de 6% em um volume de trabalho de 80 mL com uma densidade de células inicial equivalente a 0,05 unidades OD600nm. A fermentação foi conduzida por 15 horas e o caldo foi transferido para tubos cônicos de 50 mL (Falcon, BD) para permitir a separação de células por sedimentação a 30°C por 3 hr. O hidrolisado líquido clarificado foi pipetado a partir dos tubos para o frasco de Erlenmeyer sem saliências.

As culturas de semente do *S. cerevisiae* 424A(LNH-ST) fermentado por xilose foram preparadas por inoculação do estoque congelado em hidrolisado enzimático de carda de glucano a 6% diluído a 3:10 suplementado com 2% peso/peso (em peso) de CSL e a cultura foi cultivada por 18hr. As células foram coletadas e inoculadas no hidrolisado enzimático a partir de um primeiro estágio de fermentação em um volume de trabalho de 70mL com uma densidade de células inicial de 25 unidades OD600nm. A fermentação foi conduzida por outras 48hr. O *S. cerevisiae* nas culturas de semente e a fermentação de etanol em dois estágios foram cultivados microaerobicamente em frascos de Erlenmeyer sem saliências a 30°C, 150 rpm, pH 5,5 de acordo com o método descrito em Lau, M. W. et al, *Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST), Proc Nat'l Acad Sci USA, Vol. 106, Issue 5, pp. 1368-73 (2009) (Epub Data: 08 de Dezembro de 2009). As amostras foram tomadas em tempos designados e a densidade de célula foi medida conforme descrito em Lau, M. W. et al., *Ethanol production from hydrolysates from ammonia fiber expansion (AFEX) treated corn stover and distillers grain without detoxification and external nutrient supplementation*, Biotechnology and Bioengineering, vol. 99, Issue 3, pp. 529-539 (2008)(Epub Data: 24 de Janeiro de 2009).

FERMENTAÇÃO DE TRICHODERMA RESEEI RUT-C30

Os estoques de esporo de glicerol congelados de RUT-C30 foram inoculados em 2% em peso de CSL suplementado com 20 g/L de glicose a pH 5,5 (50 mM de tampão de fosfato). A pré-cultura (50mL) foi cultivada em um frasco com saliências de 250 mL a 30°C, 200rpm por 48hr. Durante a fase de indução de enzima, 18% de extrato de água de AFEX-CS equivalente de carga de sólidos (SLE) (carregado a 27,8% v/v) e/ou AFEX-CS (1% w/v) moído finamente (passado através de tela de 0,5mm) foram adicionados na pré- (60%

v/v) como o indutor de enzima. A água destilada e o tampão de fosfato foram adicionados às respectivas misturas para atingir um volume final de 50 mL. CSL adicional equivalente a uma concentração final de 1% em peso CSL foi suplementado após 24hr de indução. O caldo de fermentação foi conduzido a 30°C 120 horas e o pH foi ajustado a 5,5 a cada 24hr por adição de HCl. O volume de trabalho da fermentação durante a fase de indução foi de 50 mL. Mediante o término da fase de indução, o caldo de fermentação foi centrifugado a 2.500 x g por 30 min. O caldo de fermentação livre de células foi usado para conduzir a hidrólise enzimática em AFEX-CS de carga de glucano a 1%.

As enzimas sacarolíticas foram separadas da outra background proteína antecedente em peso molecular menor por uso de um sistema FPLC (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) equipado com uma coluna desalgagem HisPrep 26/10 de 51 ml (GE Healthcare, Lot #17-5087-01). A concentração de frações que continham as enzimas sacarolíticas foi determinada por ensaio BCA (Pierce Biotechnology, Rockfort, IL). A concentração original foi calculada levando-se em conta os fatores de diluição envolvidos.

Para comparar a eficiência de indução de extrato líquido de AFEX-CS relativo a lactose, pré-culturas de RUT-C30 (60% v/v) foram tratadas tanto com 18% de extrato líquido de AFEX-CS equivalente de carga de sólidos (SLE) (carregado a 27,8% v/v) ou com 4,17 g/L de lactose. Outros procedimentos e parâmetros de fermentação e foram mantidos idênticos para facilitar a comparação. A concentração inicial de carboidrato de ambos os indutores foi a mesma (4,17 g/L).

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AFEX-CS EM CARGA DE GLUCANA A 1%

O caldo de fermentação de RUT-C30 foi diluído por um fator de 1:6 (1 parte de caldo + 5 partes de água destilada). O caldo diluído foi usado para conduzir a hidrólise enzimática sobre AFEX-CS a 1,0% de carga de

glucano por 24hr a pH 4,8, 50 °C. A AFEX-CS foi moída finamente e passada através de uma tela de 0,25mm (Ultra Centrifugal Mill ZM 200, Retsch, Alemanha). A accellerase em dosagens variadas (0,0, 1,0, 2,0 mg de proteína/g de AFEX-CS seca) foi adicionada ao caldo diluído para investigar a
5 necessidade por suplementação de enzima exógena. Os experimentos de controle com uso de misturas de enzimas comerciais foram conduzidos para comparação. A mistura de enzima consistiu de Accellerase 1000 (120 mL/kg de CS), Multifect Xilanase (6,2 mL/kg de CS) e Multifect Pectinase (4,3 mL/kg de CS).

10

MÉTODOS ANALÍTICOS

Os níveis de oligossacarídeos foram quantificados com uso de NREL-LAP-014, um método baseado em hidrólise ácida. Glicose, xilose, arabinose e etanol são quantificados com uso de um sistema HPLC equipado com coluna HPX-87H Biorad Aminex conforme descrito em Lau et al.,
15 Biotechnology e Bioengineering 99(3): 529-39 (2008).

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AFEX-CS EM CARGO DE GLUCANA A 6%

A hidrólise enzimática (2,0 kg se sacarificação total) foi conduzida em um biorreator de 3L (Applikon, Biobundle, Foster City CA) a 50°C, pH 4,8 por 96hr. Para atingir liquefação própria e agitação durante toda a hidrólise
20 enzimática, ambos a AFEX-CS e as enzimas comerciais foram alimentadas em forma de. A AFEX-CS foi alimentada em 5 lotes (6,0%, 3,0%, 3,0%, 3,0%, 3,0% de carga de sólidos) com intervalos de 2, 1, 1, 1,5, 1,5 hr entre as respectivas adições. Com respeito a alimentação de enzima, dois terços das enzimas totais foi adicionado durante as primeiras 8 hr da alimentação (1/3, em 0 hr; 1/6, em
25 4hr; 1/6, em 8hr). O um terço remanescente das enzimas foi alimentado no reator durante as 40 horas subsequentes (1/6, 8 a 24 hr; 1/6, 24 a 48hr), a alimentação foi distribuída igualmente a cada 60min. Uma carga total de proteína de 7,4 mg proteína/g de biomassa foi usada. As enzimas comerciais e

suas respectivas dosagens usadas foram Accellerase 1000 (120 mL/kg de CS), Multifect Xilanase (6,2 mL/kg de CS) e Multifect Pectinase (6,2 mL/kg de CS). A concentração de proteína das enzimas comerciais foi analisada e o balanço de massa para a hidrólise enzimática foi construída conforme descrito em Lau, M. W. et al, *Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using Saccharomyces cerevisiae 424A(LNH-ST)*, Proc Nat'l Acad Sci USA, Vol. 106, Issue 5, pp. 1368-73 (2009) (Epub Data: 08 de Dezembro de 2009).

ISOLAMENTO DE PROTEÍNA EXTRACELULAR DE TRICHODERMA POR PROTEÔMICA

As proteínas extracelulares dos caldos fungosos foram isolados com uso de um método de precipitação por clorofórmio/metanol conforme descrito por Wessel & Flügge, *Analytical Biochemistry* 138(1): 141-143 (1984) e Jiang et al., *Journal of Chromatography A* 1023(2): 317-320 (2004). O metanol frio em quatro partes de volume foi adicionado a uma parte de volume do caldo e bem vortexados. O clorofórmio frio em uma parte de volume seguido por água fria em três partes foi então misturado e vortexado novamente. A mistura foi centrifugada a 15.000 g a 4 °C por 10 min após o qual a camada aquosa (superior) foi descartada e o metanol frio em quatro partes foi adicionado. A mistura foi centrifugada a 15.000 g a 4 °C por 30 min após o qual o sobrenadante líquido foi cuidadosamente removido sem perturbar as partículas de proteína precipitadas. As partículas de proteína foram secas a ar durante a noite e redissolvidas em tampão de buffer SDS-PAGE (Tampão de Preparação de Amostra NuPAGE® LDS, Invitrogen, CA) previamente a análise proteômica.

IDENTIFICAÇÃO HOMÓLOGA DE PROTEÍNA E PROTEÔMICA

As proteínas redissolvidas (~400 µg) foram carregadas em um SDS-PAGE gel (NuPAGE®, Invitrogen, CA) e a eletroforese foi executada a 50 V por 15 min para comparar as proteínas dentro do gel. Tiras de gel foram então cortadas e sujeitadas a digestão triptica em gel (Shevchenk et al., *Anal. Chem.* 68(5): 850-58 (1996)). Os peptídeos extraídos foram re-suspensos em

uma solução de 2% de Acetonitrila e 0,1% de Ácido tricloroacético para um volume de 20 µl. A partir desta solução, 10 µl foram automaticamente injetados por um Gerenciador de Amostra Waters nanoAcquity (www.waters.com) e carregado por 5 minutos em um coletor de peptídeo Waters Symmetry C18 (5µm, 180µm x 20mm) a 4µL/min em 2% de Acetonitrila/0,1% de Ácido Fórmico. Os peptídeos ligados foram então eluídos com uso de um UPLC Waters nanoAcquity (Tampão A = 99,9% de Água/0.1% Ácido Fórmico, Tampão B = 99,9% de Acetonitrila/0,1% de Ácido Fórmico) em uma coluna Michrom MAGIC C18AQ (3u, 200 Angstrom, 100µm x 150mm, www.michrom.com) e eluído por 60 minutos com um gradiente de 2% de B a 30% de B em 46min, adicionados a 90% de B em 47 minutos e equilibrados de volta a 5% de B após 49 minutos a uma taxa de fluxo de 1 µl/min. Os peptídeos eluídos foram aspergidos em um espectrômetro de massa ThermoFisher LTQ-FT Ultra (www.thermo.com) com uso de uma fonte de nanospray Michrom ADVANCE. Varreduras de inspeção foram tomadas no FT (25000 resolução determinada a m/z 400) e os dez íons mais encontrados em cada varredura de inspeção são então sujeitados a dissociação induzida por colisão de baixa energia automática (CID) no LTQ. Os espectros MS/MS resultantes são convertidos em listas de pico com uso de BioWorks Browser v3.3.1 (ThermoFisher) com uso dos parâmetros LTQ-FT Ultra predefinidos e buscados com uso do algoritmo de busca v2.3 (www.matrixscience.com) contra entradas de proteínas de fungos a partir do NCBI, baixado em 13/11/2009, e contra a base de dados de proteína de *Trichoderma reesei*, v2.0, baixada do DOE Joint Genome Institute (JGI). Os parâmetros Mascot para todas as bases de dados permitiram até 2 sítios tripticos perdidos, modificação fixa de carbamidometil cisteína e modificação variável devido a oxidação de metionina. A tolerância de peptídeos e fragmento MS/MS foi ± 10 ppm (monoisotópico) e 0,60 Da (monoisotópico), respectivamente. A saída Mascot foi então analisada

com uso de Scaffold (www.proteomesoftware.com) para validar probabilisticamente as identificações de proteína com uso do algoritmo de computador ProteinProphet (Nesvizhskii et al., Anal. Chem. 75(17): 4646-58 (2003)). Os critérios mínimos para atribuição de proteína positiva foram ao menos dois peptídeos e >95% de filtro de confiança conforme determinado por Scaffold. As sequências de proteína não caracterizadas e/ou putativas foram BLAST contra a base de dados UniprotKB para identificar homologamente a proteínas similares de outros micróbios.

RESULTADOS E ANÁLISE ADICIONAIS

10 TEORES DE NUTRIENTE E BALANÇOS DURANTE O PROCESSAMENTO DE PALHA DE MILHO TRATADA POR AFEX (AFEX-CS)

O teor de aminoácido, oligoelementos e vitamina do hidrolisado enzimático em carga de celulose a 6% celulose foi analisado e quantificado. Os resultados são mostrados abaixo nas Tabelas 4 e 5. O hidrolisado enzimático continha 800 ± 50 mg/L de amônia e 1231 ± 44 mg de total de aminoácidos, do qual 16% por peso estavam na forma de aminoácidos livres conforme mostrado na Tabela 4 abaixo. O ácido glutâmico (Glu), glicina (Gly) e alanina (Ala) foram os três aminoácidos mais abundantes encontrados no hidrolisado. A concentração de aminoácido é mais alta que aquela de um mosto de malte típico para aplicações de cervejaria (800 a 900 mg/L de aminoácidos totais).

TABELA 4. CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDO DE PALHA DE MILHO DE AFEX (AFEX-CS) HIDROLISADO ENZIMÁTICO

Componentes	Hidrolisado por AFEX (mg/L)	
	Livre	Total
NH ⁴⁺	750±50	
Asparagina (Asp)	8,4±1,7	75,9±1,7

Componentes	Hidrolisado por AFEX (mg/L)	
	Livre	Total
Ácido Glutâmico (Glu)	0,0±2,4	133,8±2,4
Serina (Ser)	16,8±3,8	104,2±3,8
Glicina (Gly)	5,2±5,8	127,2±5,8
Histidina (His)	4,5±2,3	34,3±2,3
Treonina (Thr)	17,6±4,6	98,9±4,6
Arginina (Arg)	17,1±3,2	55,0±3,2
Alanina (Ala)	11,6±2,9	110,2±2,9
Prolina (Pro)	30,4±2,3	108,7±2,3
Treonina (Thr)	30,0±2,5	28,6±2,5
Valina (Val)	9,9±2,2	68,8±2,2
Metionina (Met)	2,6±1,9	19,4±1,9
Isoleucina (Ile)	7,6±2,2	55,4±2,2
Leucina (Leu)	0,0±3,8	93,6±3,8
Lisina (Lys)	18,4±1,3	25,7±1,3
Fenilalanina (Phe)	15,7±3,8	91,6±3,8
Total	195,8±28,3	1231±43,8

Dez oligoelementos conhecidos por serem úteis em cultivo microbiano foram comparados em excesso a valores sugeridos na literatura para fermentação de levedura. Vide Walker, G.M. in *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 54. (eds. A.I. Laskin, J.W. Bennet & G.M. Gadd) (Elsevier Academic Press, Nova Iorque, NY; 2004) (doravante “Walker”). O magnésio (269±6mg/L) foi considerado por estar em um nível suficiente conforme mostrado na Tabela 5. As concentrações de ácido pantotênico, piridoxina, ácido nicotínico e biotina excederam os níveis vistos em um mosto de malte típico. O nível de tiamina (0,4 µM) é levemente inferior à faixa de concentração

de “referência” de 0,57 a 2,83 μM . Vide Walker.

A AFEX-CS foi a fonte predominante de proteína, oligoelementos e vitaminas no hidrolisado enzimático. A contribuição de enzimas comerciais para os níveis de nutriente foi muito baixa.

5 **TABELA 5. OLIGOELEMENTOS E VITAMINAS DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE AFEX-**

CS				
			Unidade	AFEX-CS Hidrolisado
Oligoelementos	Mg	Magnésio	mg/L	168,42±3,24
	Ca	Cálcio		242,87±7,72
	Mn	Manganês		2,32±0,53
	Co	Cobalto	µg/L	11,3±3,8
	Ni	Níquel		13,5±5,3
	Cu	Cobre		116,2±9,3
	Zn	Zinco		505,7±51,3
	Mo	Molibdênio		15,9±0,6
	Fe	Ferro		296,4±74,5
Vitaminas	Ácido Pantatênico		µM	1,50±0,12
	Piridoxina			1,26±0,18
	Ácido Nicotínico			10,87±1,38
	Biotina			~0,05
	Tiamina			~0,66

A Tabela 6 mostra os resultados completos da análise de mineral para CS não tratada, AFEX-CS e sólidos residuais após a hidrólise enzimática.

TABELA 6. RESULTADOS COMPLETOS DA ANÁLISE DE MINERAL PARA CS NÃO TRATADA, AFEX-CS E SÓLIDOS RESIDUAIS APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Concentração (mg/kg)	Palha de Milho Kramer Não tratada	Palha de Milho Kramer AFEX	Sólido Residual após Hidrólise enzimática de Glucano a 6%
Cr	3,4E+01	1,2E+01	1,2E+00
Co	5,8E-01	1,2E-01	7,5E-02
Ni	1,6E+01	5,3E+00	1,3E+00
Cu	3,9E+00	3,4E+00	9,5E+00
As	1,0E-01	7,2E-02	Não detectado
Cd	9,1E-02	7,5E-02	2,0E-01
Pb	1,8E+00	1,0E+00	2,4E+00
Mo	4,9E+00	1,9E+00	1,9E+00
U	7,9E-02	6,0E-02	1,8E-01
Mn	1,5E+01	1,2E+01	8,2E+00
Zn	8,5E+00	8,1E+00	1,9E+01
Se	Não detectado	Não detectado	Não detectado
Ba	2,8E+01	2,5E+01	2,9E+01
Fe	1,8E+02	1,2E+02	1,1E+02
Ca	1,9E+03	1,8E+03	1,8E+03
P	6,3E+02	6,5E+02	8,5E+02
Na	Não detectado	Não detectado	2,0E+02
K	1,1E+04	1,2E+04	2,5E+03
Mg	8,7E+02	8,5E+02	2,7E+02
Total	1,5E+04	1,5E+04	5,8E+03

A Tabela 7 mostra os resultados completos da análise de mineral para extrato de água SLE a 9% de AFEX-CS e AFEX-RS.

TABELA 7. RESULTADOS COMPLETOS DA ANÁLISE DE MINERAL PARA EXTRATO DE
ÁGUA SLE A 9% DE AFEX-CS E AFEX-RS

	Palha de Arroz de Extrato de água SLE a 9%	Palha de Milho de Extrato de água SLE a 9%	Concentração
Cr	8,08	Não detectado	µg/L
Co	21,92	82,73	
Ni	61,16	29,79	
Cu	143,47	89,41	
As	64,94	Não detectado	
Cd	Não detectado	Não detectado	
Pb	Não detectado	17,65	
Mo	33,33	23,21	
U	Não detectado	Não detectado	
Mn	12186,09	198,19	
Zn	278,71	126,63	
Se	Não detectado	Não detectado	
Ba	334,01	465,36	
Fe	437,18	152,98	
P	Não detectado	Não detectado	
Na	37,34	Não detectado	mg/L
Mg	96,23	57,33	
Ca	Não detectado	73,40	
K	1,62	1,16	g/L

A AFEX-CS a 18% de carga de sólidos (6% de carga de glucano) foi hidrolisada com enzimas com uso de enzimas disponíveis comercialmente.

- 5 Cerca de 85% do total de carboidrato foi hidrolisado e solubilizado no fluido

líquido, atingindo-se uma concentração total de açúcares solúveis de 110 g/L. Vide a FIGURA 7.

O balanço de massa com relação ao total de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) confirmaram que de 80 a 82% do total de nitrogênio e potássio a partir da AFEX-CS foi solubilizada no fluido líquido (hidrolisado). No entanto, maioria do teor de fósforo (64%) foi deixada nos resíduos sólidos seguindo-se a hidrólise enzimática. Vide a FIGURA 8.

TESTE EMPÍRICO EM FERMENTAÇÃO DE ETANOL COM USO DE EXTRATO DE ÁGUA A PARTIR DE CS TRATADA POR AFEX CS (AFEX-CS) E RS TRATADA POR AFEX (AFEX-RS)

Um extrato de água com uma carga de sólidos equivalente de 9%, que contém constituintes de biomassa parcialmente solubilizada, foi gerado a partir de ambas as AFEX-CS e AFEX-RS. Glicose foi adicionada como fonte de carbono para produzir uma concentração final de 100 g/L. Após 48 horas de fermentação com uso de *S. cerevisiae* 424A(LNH-ST), a glicose em ambos extratos de água foi completamente consumida. A densidade final de célula de levedura em levedura (em 48 horas) foi de 4,5 a 5,5 g secos peso/L. (FIGURAS. 9A e 9B). Esses valores foram maiores que a fermentação em base de nitrogênio de levedura (YNB; 13,7 g/L), mas não tão altos quanto em extrato de levedura + peptona (YEP; 5 g/L de extrato de levedura + 10 g/L de peptona). Esses resultados indicam que os níveis de nutriente maiores que 9% de carga de sólidos equivalente a partir das CS e RS pré-tratadas são suficientemente altos para suportar a fermentação de levedura. Além disso, conforme indicado pelos dados, os nutrientes estão em excesso em um hidrolisado de carga sólida mais alta e assim tal extrato de água ou hidrolisado pode suportar múltiplas fermentações.

FERMENTAÇÃO DE ETANOL EM DOIS ESTÁGIOS COM USO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE NATIVO E RECOMBINANTE

Para investigar ademais o potencial de uso de palha de milho em

alta carga de sólidos para suportar múltiplas fermentações, o hidrolisado de AFEX-CS a partir de sacarificação de carga a 18% em peso foi fermentado primeiro pelo *S. cerevisiae* nativo (ATCC 4124) por 15 horas, antes as células de levedura foram separadas do hidrolisado por sedimentação por 3 horas (FIGURA 9C). No segundo estágio, a alta densidade de células (11,25 g seco

5 (FIGURA 9C). Na fermentação de segundo estágio em alta densidade de células, 87% da xilose foi consumido dentro das primeiras 24hr da inoculação de *S. cerevisiae* recombinante. Uma concentração final de etanol de 39 g/L foi atingida com rendimento metabólico de etanol a 92,1% do máximo teórico (FIGURA10A).

15 As células de *S. cerevisiae* 424A recombinante (LNH-ST) foram recicladas e usadas nos três ciclos subsequentes de fermentação (FIGURA 9D). Em essência, a fermentação de xilose com uso das células de levedura recicladas atingiu uma eficiência similar comparada a células novas (FIGURA 10B). Esta efetividade reduziu a necessidade por células novas nos lotes

20 sucessivos de fermentação sem diminuir significativamente a taxa de fermentação de xilose, uma potencialmente significativa economia de custo.

PRODUÇÃO INTERNA DE ENZIMA

O *Trichoderma reesei* RUT-C30 foi primeiro cultivado em meio que consiste de 2% em peso de Licor de Lavagem de Milho e 20 g/L de glicose

25 por 36 horas. As enzimas sacarolíticas foram induzidas por 96 horas por uma mistura de extrato de sólidos e líquidos a partir de AFEX-CS (FIGURA 11A). A Tabela 8 mostra os indutores de enzima usados para fermentação de *T. reesei* RUT-C30 pelas FIGURAS 11B, 11C e 11).

TABELA 8. INDUTORES DE ENZIMA PARA FERMENTAÇÃO DE *T. reesei* RUT-C30**PELAS FIGURAS 11B A 11D**

FIGURA	mistura de AFEX-CS	Lactose (g/L)
11B	5,4% de extrato de água SLE (contendo 4,17 g/L de equivalente de açúcar total)	4.17
11C	5,4% de extrato de água SLE + 1% w/v de AFEX-CS	N/A
11D	(WE): 5,4% de extrato de água SLE (AFCS + WE): 5,4% extrato de água SLE + 1% w/v de AFEX-CS	4.17

Conforme mostrado na FIGURA 11B, a concentração de enzima sacarolítica produzida foi de 2,7 g/L o que forneceu 18% em peso de hidrólise enzimática em 15 mg de enzima proteína por grama de palha de milho. Cerca de 13% da proteína induzida por CSL foi convertida em enzimas sacarolíticas.

O caldo de *T. reesei* foi diluído por um fator de 1:6 e o caldo diluído foi usado para hidrolisar a AFEX-CS em 1 % de carga de celulose por 24 h com ou sem enzimas adicionais (Accellerase 1000). A hidrólise enzimática com uso de caldo de *T. reesei* interno diluído a 1:6 atingiu o rendimento total de açúcar solúvel em 15 g/L dentro de 24hr (85,6% de rendimento máximo teórico) (FIGURA 11B). Este nível de rendimento total de açúcar é comparável àquele da mistura de enzima padrão baseado em enzimas comerciais (15,7 g/L; 89,4%) o que sugere que a unidade de produção interna de enzima pode suportar uma hidrólise enzimática efetiva a alta carga de sólidos (FIGURA 11B). Para açúcares monoméricos, a carga de *Accellerase* a 1,5 a 2 mg proteína/g de palha de milho foi usada para atingir açúcar monomérico a

rendimentos similares àqueles fornecidos pela mistura padrão, em que 13,7 g/L de total de glicose e xilose monoméricas foi obtido (FIGURA 11B).

Foi também descoberto que a mistura de AFEX-CS usada para a indução de enzima foi de aproximadamente 2,5 a 7 vezes mais potente que a lactose em uma mesma base ponderal de açúcar. A hidrólise enzimática por *T. reesei* atingiu 10,4 g/L (59% de total de glicose/rendimento de hidrólise de xilose) líquidos de aumento em rendimento de açúcar quando o extrato de AFEX-CS foi usado para indução ao invés de lactose em uma mesma base inicial equivalente de açúcar (FIGURA 11B).

Houve pouca diferença na abundancia (dentro de duas vezes) da maioria das celulasas (por exemplo, Cel7A, Cel6A, Cel74A, Cel7B, Cel5A, e β -manase) expressas por *T. reesei* com uso de AFEX-CS ou lactose. No entanto, o tratamento por AFEX-CS de *T. reesei* resultou em um aumento significativo (> 2 vezes e abundância de proteína) em expansão de diversas endocelulasas (Cel61A, Cel12A) e hemicelulasas (por exemplo, β -xilosidase, endoxilanasas, α -arabinofuranosidasas, CIP2, acetil xilano esterases, α -glucuronidase, poligalaturonase) que não foram previamente observadas para *T. reesei* induzido por lactose. A FIGURA 11D mostra a abundância relativa de proteínas expressas com uso de AFEX-CS ou lactose, onde uma diferença maior que duas vezes em abundância foi observada em relação ao controle de lactose.

O uso de palha de milho tratada por AFEX (com AFCS ou AFCS+WE como indutor) resultou em aumento significativo em expressão de diversas novas famílias de endocelulasas (Cel61A, Cel12A) e hemicelulasas (β -xilosidase, endoxilanasas, α -arabinofuranosidasas, CIP2, acetil xilana esterases, α -glucuronidase, poligalaturonase) que estão tipicamente faltando a partir de proteoma de *Trichoderma reesei* RUT-C30 induzida por lactose.

Curiosamente, o uso de biomassa sólida tratada por AFEX juntamente com extrato de água de AFCS foi responsável por induzir diversas

enzimas (Cel12A, Cel61A, α -glucuronidase, poligalacturonase, β -galactosidase, α -galactosidase, acetil esterase e outras) que foram ou não foram expressas ou estavam presentes em abundâncias muito baixas quando se usou somente extrato de água de AFCS. Isto sugere que a presença de
 5 biomassa lignocelulósica pré-tratada sólida é útil para induzir a expressão de um conjunto mais compreensivo e CAZymes do que com uso somente de indutores solúveis de biomassa lignocelulósica pré-tratada.

A expressão de α -glucuronidase, α -galactosidase e acetil esterase somente na presença de biomassa sólida também sugere certos componentes
 10 hemicelulósicos insolúveis (por exemplo, xilano ramificado decorado com cadeias laterais de ácido glucurônico) presos na matriz da parede celular que são necessários para induzir essas enzimas. Mediante as condições de AFEX empregadas, deveria haver ao menos de 10 a 15% de ésteres acetil intactos em paredes celulares de palha de milho que são provavelmente responsáveis por
 15 indução e expressão de acetil esterases (JGI#121418). No entanto, outra acetil xilano esterase (JGI#54219) foi expressa em níveis de abundância similares para ambas as AFCS e AFCS-WE, mas foi ausente quando induzida somente por lactose. Níveis mais altos em 10 a 15 vezes de abundância de CIP2 para AFCS/AFCS+WE comparados a somente lactose foram também vistos.

20 Uma quantidade significativa de oligômeros de arabino-xilano foi liberada das paredes celulares da palha de milho após o AFEX, o que pode explicar o grande aumento observado em expressão de β -xilosidase que é provavelmente induzido por esses oligômeros de hemicelulose.

EXEMPLO 5

25 **FERMENTAÇÃO DE LOTE ALIMENTADO DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE AFEX-CS**
COM USO DE ENZIMA QUE SECRETA *THERMOANAEROBACTERIUM SACCHAROLYTICUM*
ETANOLOGÊNICA

A fermentação de lote alimentado foi conduzida em um

fermentador feito por medida (NDS Technologies, NJ) equipado com uma sonda de pH. A temperatura do fermentador foi controlada por um sistema de recirculação de banho de água externo. A alimentação e o pH foram controlados pelo sistema Sartorius A plus (Goettingen, Alemanha). O volume inicial do reator foi de 120 mL que consistiu de 20 mL de hidrolisado enzimático a 18% de carga de sólidos, suplemento de nutriente e água destilada (para diluição). Para a suplementação de nutriente, 1 g de extrato de levedura, 0,5 g peptona e 10 mL de estoque concentrado para solução B, C, D e E (Vide Tabela 9) foram adicionados.

10

TABELA 9: MEIO MTC PARA CULTIVO DE *T. SACCHAROLYTICUM* ALK2

		Conc. Final
Solução A	Extrato de levedura	10 g/L
	Triptona	5 g/L
	MES (tampão)	10 g/L
Solução B	Sal de potássio de ácido cítrico	2,00 g/L
	Ácido cítrico monohidratado	1,25 g/L
	Sulfato de sódio (Na_2SO_4)	1,00 g/L
	Fosfato di-hidrogênio de potássio (KH_2PO_4)	1,00 g/L
	Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)	2,50 g/L
Solução C	Ureia	5,00 g/L
	Cloreto de amônia (NH_4Cl)	1,50 g/L
Solução D	Cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,00 g/L
	Cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,20 g/L
	Cloreto de Ferro (II) tetra-hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g/L
	L-cisteína hidrocloreto monohidratado	1,00 g/L
Solução E	Di-hidrocloreto de piridoxamina	0,020 g/L
	Ácido aminobenzóico P	0,004 g/L
	D-Biotina	0,002 g/L
	Vitamina B_{12}	0,002 g/L

O meio de fermentação foi de pH ajustado a 6,2 com KOH e difundido com nitrogênio por cerca de 10 min para criar um condição anaeróbica. A cultura de semente (10mL) foi inoculada para iniciar a fermentação. O hidrolisado enzimático de 18% de carga de sólidos não diluído a pH 6,2 (suplementado com 10 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona), foi usado como a alimentação. A alimentação começou 4 horas após a inoculação à taxa de 4 mL/hora até que 180 mL de volume de alimentação foram adicionados ao fermentador. Amostras foram tomadas nos períodos designados. Glicose, xilose, arabinose (em forma monomérica) e etanol foram analisados com uso de HPLC. Os açúcares oligoméricos foram analisados através de hidrólise ácida baseada no Protocolo NREL LAP-014.

Na fermentação rica em nutrientes suplementados, quase 90% do total de açúcares (monômeros e oligômeros) no hidrolisado foram consumidos e um rendimento metabólico de 0,45 g de EtOH/ g de açúcares consumidos foi atingido (Vide FIGURAS 12A e 12B). A fermentação foi completada dentro de 64 hr após a inoculação; 15 hr após a alimentação ter sido concluída. Mais de 60% do total de açúcares oligoméricos foi consumido neste período de tempo. Demonstrou-se que o ALK2 é capaz de cultivar e produzir etanol a 30 g/L a 0,45 g/L/hr (0 a 64hr) a partir de hidrolisado que contém compostos de degradação equivalentes a 11,7% de carga de sólidos de AFEX-CS.

EXEMPLO 6

Para determinar a possibilidade dessas alterações em uma refinaria comercial, um modelo tecno-econômico do esquema proposto foi criado e comparado a um esquema convencional de produção de etanol. Este modelo foi baseado no modelo desenvolvido por NREL. Vide, por exemplo, Ordóñez, C. et al. Bioresour. Technol. 78: 187-190 (2001) e Patente N° U.S. 4.624.805 a Lawhon, emitida em 25 de Novembro de 1986. O modelo foi adaptado para pré-tratamento por AFEX. Vide, por exemplo, El-Adaway, T. et

al. Food Chem. 74: 455-462 (2001).

As alterações no modelo foram feitas na seção devotada para conversão biológica. Por exemplo, assumiu-se que todos os processos a montante e a jusante poderiam ser os mesmos. Os rendimentos de hidrólise, enzima, etanol e produção de levedura e consumo de nutriente foram todos estimados a partir de dados experimentais. O rendimento de etanol usado na análise foi de 276 L/ton. Esta projeção foi baseada no resultado da fermentação de lote alimentado por *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2 em hidrolisado de AFEX-CS (Exemplo 4) onde cerca de 60% dos celoligosacarídeos foram consumidos durante fermentação, o que aumentou o rendimento geral de 246 L/ton para 276 L/ton.

Para as alterações no desenho do processo, as premissas em uso de força e equipamento e tamanho foram tomadas a partir dos modelos NREL sempre que possível e estimado a partir dos valores da literatura quando apropriado.

No modelo inicial, o tempo total de hidrólise e fermentação foi definido a 168 horas, embora os dados atuais sugiram que 72 horas para hidrólise e 72 horas para fermentação seriam suficientes. Enquanto sacarificação e fermentação simultâneas podem ocorrer, isto não foi explicitamente modelado como tal. Ao invés disso, os rendimentos de hidrólise e etanol foram estimados com base em dados experimentais prévios. Com formulação de enzima aperfeiçoada, no entanto, espera-se que os rendimentos sejam aperfeiçoados sobre aqueles apresentados na literatura e açúcares monoméricos possam aumentar em relação aos açúcares oligoméricos.

Assume-se que todas as necessidades de calor e força como sendo suprimidas por queima de lignina. Nenhum foi considerado para uso na etapa de conversão biológica e todas as alterações de temperatura foram consideradas como sendo alterações "brandas". Assim, nenhuma alteração

nas necessidades de calor foi feita em relação ao modelo NREL, como se assumiu que a integração de calor é possível para suprimir todas as alterações em energia. Para a eletricidade, as necessidades adicionadas de pressões e agitação para a fermentação de *T. reesei* foram incluídas.

5 A FIGURA 13 mostra uma realização de um diagrama de fluxo de processo do modelo de computador de conversão biológica proposto, isto é, uma operação simulada que não foi ainda posta em prática. Neste modelo, uma mesa de lavagem é usada para molhar a biomassa após o pré-tratamento por AFEX, com uso de hidrolisado reciclado diluído como meio de água. A
10 biomassa é desidratada com uso de uma prensa helicoidal. Assume-se que o efluente de água seja rico em açúcares oligoméricos produzidos durante o AFEX (e o reciclado da hidrólise) e é assim usado para induzir a produção de enzima *T. reesei*. Como uma aproximação inicial, assume-se que o fungo consuma 3 g de açúcar para cada grama de enzima produzida. A
15 produção de enzima é modelada como uma reação de primeira ordem de açúcar oligomérico com uma taxa constante de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Isto é suficiente para produzir 76% das enzimas necessárias para hidrólise lignocelulósica. O tempo total de fermentação de *T. reesei* assume-se inicialmente como sendo de 96 horas.

20 Neste modelo um total de 10 g de Licor de Lavagem de Milho (CSL) é consumido por kg de biomassa para fornecer os nutrientes necessários para cultivo de *T. reesei* e produção de enzima. Uma carga de enzima sacarolítica de 3 a 6 mg/g é assumida. Da mesma forma, a biomassa contém aproximadamente 6 g de nitrogênio por kg de biomassa na forma de
25 acetamida, quase quatro vezes tanto nitrogênio quanto necessário para enzimas. A acetamida não é consumida por *T. reesei*, mas é por outros organismos. Assim, se o fungo pode ser modificado para consumir acetamida e pode ser adaptado mais completamente para palha de milho tratada por

AFEX, então muito menos suplementação de nutrientes será necessária.

Após a hidrólise enzimática, uma prensa pneumática é usada para separar os sólidos e os líquidos. Esta prensa usa ar comprimido para forçar mais água para fora da biomassa, reduzindo o teor de umidade para 50% do peso total. Este pacote é usado no modelo NREL após a destilação, e as mesmas premissas econômicas são usadas aqui. Porque nenhuma solubilização adicional de biomassa ocorre após a hidrólise, o custo da prensa pneumática não é diferente neste modelo do que é no modelo NREL. O líquido liberado a partir da prensa é usado como o meio de fermentação. No entanto, a biomassa insolúvel ainda retém alguma água, que inclui açúcares hidrolisados. Para garantir que todos os açúcares hidrolisados sejam usados, a biomassa é limpa com água fresca e então desidratada com uso de prensa de filtro. Este resíduo então sai do processo e é queimado para calor e força. A água limpa é separada em múltiplos fluidos. Muito da água é usado como o meio de meio de *T. reesei* fermentação e como a água limpa para obter indução de *T. reesei*. A água remanescente é usada como uma cultura de semente para fermentação de levedura ou combinada no meio de fermentação.

A fermentação é separada entre fermentação de glicose e de xilose. Um tanque de preparação é colocado a entre fermentação de glicose e de xilose para recuperar a levedura. Com uma primeira aproximação, um tempo de permanência de 3 horas é usado para assentar 95% da levedura, com base em dados experimentais. Uma levedura assentada é seca em um túnel secador antes de ser vendida. Assumiu-se que esta energia fosse na norma de vapor e poderia reduzir a produção de eletricidade em 30% da necessidade total de energia. O tempo de fermentação de glicose foi de 15 horas e o de xilose foi de 46 horas. Após a fermentação de xilose, outro tanque de preparação é usado para reciclar a levedura, enquanto o caldo de fermentação é então enviado para destilação.

A matéria prima é palha de milho, e a composição é baseada em teor de açúcar monomérico equivalente. Após o pré-tratamento por AFEX, alguns dos carboidratos são convertidos a açúcares oligoméricos, que são usados para induzir a produção de enzima. Durante a hidrólise de celulose, assume-se que 18% da carga de sólido como suficiente para produzir 40 g/L de etanol (7). Para simplicidade, assume-se que as enzimas internas e as enzimas exógenas do caldo têm a mesma atividade sobre todos os carboidratos, e assim uma constante de 10 g/kg de enzimas é adicionada independente da fonte. Na realidade, uma atividade constante poderia ser adicionada, o que pode significar diferentes quantidades de enzimas, dependendo da escala de produção interna. Durante hidrólise, se espera que a maioria das enzimas seja desativada ligando-se permanentemente à biomassa. Neste estudo, assumiu-se que 90% das enzimas fossem desativadas e assim quaisquer enzimas recicladas representam somente uma pequena fração do total.

Para a fermentação, assume-se que a glicose monomérica é completamente consumida, conforme demonstrado em dados experimentais. Nenhum açúcar oligomérico foi consumido e o consumo máximo de xilose é de somente 80% do total de açúcar presente. Em adição, o total de xilose consumido é baseado em um taxa linear de 0,05 g de açúcar por g de levedura por hora. Esses experimentos apresentados aqui sugerem que o consumo de xilose é quase linear em alta densidade de células e aproximadamente 80% do açúcar são consumidos. Quando nenhuma reciclagem de célula é realizada, o cultivo de levedura está somente presente durante a fermentação de glicose. Algum cultivo de célula está presente durante a fermentação de xilose em alta densidade de célula, mas em menor quantidade. Assume-se que a fermentação de glicose seja levemente mais eficiente na produção de etanol, com um rendimento metabólico de etanol de 0,48 g de etanol por g de glicose

comparado a 0,45 g de etanol por gramas de xilose consumidos. Assume-se que a hidrólise e fermentação de seja idêntica a da xilose, e assim todos os dados do modelo estão no total de pentoses.

A FIGURA 14A a 14C mostra o efeito de alterar variáveis na rentabilidade da abordagem proposta. Tanto o rendimento como o preço de venda do etanol predominam da economia desta abordagem, como o etanol responde por mais de 80% da receita na abordagem proposta. Da mesma forma, o preço de venda de levedura nativa pode ter um impacto, como a margem geral no caso base (\$28/Mg) é similar à receita total de levedura (\$22/Mg de matéria-prima). Curiosamente, o preço de compra enzimas não impacta em grande medida no lucro, um aumento de 33% no preço se traduz em 10% de diminuição no lucro. Assim, apesar de ser um maior fator desconhecido na produção de etanol celulósico, produzindo-se a maioria das enzimas em sítio, a influência de custos de enzima diminui. Outras considerações, incluindo o tempo de fermentação de xilose, tempo de permanência de fermentação de *T. reesei* e necessidades de nutriente para fermentação de *T. reesei*, não tiveram grandes impactos sobre a rentabilidade da refinaria, sugerindo que a abordagem geral é possível e robusta. Todas as maiores suposições do processo são mostradas na Tabela 10 abaixo.

20

TABELA 10. SUPOSIÇÕES DO PROCESSO

	Baixo	Padrão	Alto	Unidade
Tempo de fermentação de xilose	12	24	36	horas
Necessidade de CSL	0	10	20	g/kg de BM
Tempo de fermentação de <i>T. reesei</i>	60	96	132	horas
Custo de enzima	2400	3600	4800	\$/Mg de enzima
Preço de venda de levedura	500	800	1100	\$/Mg de levedura
Rendimento de etano	236	275	311	L/Mg de BM
Preço de venda de etanol	1,4	1,7	2	\$/gal de EtOH

EXEMPLO 8 (TEÓRICO)

Testes adicionais com outros materiais de biomassa serão realizados. Espera-se que o extrato aquoso simule o cultivo e desempenho de organismos de bioprocessamento consolidado potencial tais como *Clostridium*
5 *thermocellum*.

CONCLUSÃO

As várias realizações descritas no presente fornecem estimulantes para desenvolver o cultivo microbiano a partir de extratos aquosos levemente alcalinos a partir de biomassa tratada por AFEX. Em uma
10 realização, um método que compreende a extração de solúveis a partir da biomassa lignocelulósica pré-tratada (por exemplo, palha de milho) com um meio de cultivo que produz enzima celulase enzima (*T. reesei*), na presença de uso de água e extrato aquoso como meio de cultivo para o fungo que produz enzima celulase (*T. reesei*), é fornecido. Em uma realização, a biomassa
15 lignocelulósica pré-tratada é biomassa lignocelulósica pré-tratada por expansão de fibra por amônia.

O teste descrito nos Exemplos 1 a 3 foram direcionados a desenvolver estimulantes de cultivo microbiano (MGS) a partir de extratos aquosos levemente alcalinos a partir de biomassa pré-tratada, tal como
20 biomassa tratada por AFEX, tal como com uma enzima celulase. No entanto, tais métodos contemplam lavagem, desintoxicação e/ou suplementação de biomassa tratada por AFEX com nutrientes com o objetivo de fornecer produtos finais adequados úteis como materiais iniciais em uma instalação de produção de biocombustível. Por outro lado, as realizações no presente também utilizam
25 nutrientes contidos dentro da própria biomassa, tais como proteína e minerais durante a produção e fermentação de enzima. Como tal, as várias realizações descritas no presente fornecem um novo paradigma na indústria de biomassa em que a biomassa tratada por AFEX pode não somente servir como a fonte

de carbono e nitrogênio em uma instalação de produção de biocombustível, mas pode também fornecer uma fonte de outros nutrientes, tais como proteína e minerais sem lavagem, desintoxicação ou suplementação de nutriente.

Simultaneamente atingir sustentabilidade econômica, ambiental e social é um maior desafio para a indústria emergente de combustível líquido renovável. Abordou-se este problema demonstrando-se um paradigma de biorefinaria celulósica que produz etanol e precursor de alimento com uso de biomassa lignocelulósica como a fonte exclusiva para carboidrato e minerais. O hidrolisado enzimático a partir de palha de milho pré-tratada por Expansão por Fibra de Amônia (AFEX) a 18% em peso de carga de sólidos foi descoberto como sendo rico em nutrientes. Este hidrolisado foi fermentado completamente dentro de 48 hr em dois estágios para produzir etanol e células levedura nativa como um co-produto. A unidade de produção de enzima sacarolítica interna com uso de palha de milho pré-tratada por AFEX como um indutor elimina a necessidade por enzima exógena. A mistura de indutor foi de 2,5 a 7 vezes mais potente que a lactose, um indutor de enzima comercial comum, sobre a mesma base ponderal de açúcar. A análise econômica com base no paradigma proposto indicou aumentos substanciais em margens de lucro em relação ao modelo econômico NREL 2005 que atribuiu amplamente ao valor de células de levedura nativa e a redução de custo de celulase através da produção interna.

Todas as publicações, patentes e documentos de patente são incorporados a título de referência ao presente, cada um em sua totalidade, ainda que individualmente incorporados a título de referência. No caso de quaisquer inconsistências, a presente revelação, incluindo quaisquer definições nesta, prevalecerão.

Embora realizações específicas tenham sido ilustradas e descritas no presente, será perceptível por aqueles versados na técnica que qualquer organização que seja calculada para atingir o mesmo propósito pode

ser substituída pela realização específica mostrada. Esta aplicação pretende abranger quaisquer adaptações ou variações do presente assunto em questão. Sendo assim, é manifestadamente pretendido que as realizações desta invenção sejam limitadas somente pelas reivindicações e equivalentes a estas.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO, caracterizado pelo fato de que compreende:

- tratamento da biomassa de planta com um pré-tratamento de amônia para fornecer uma biomassa de planta pré-tratada com amônia, em que a biomassa de planta é de uma ou mais plantas; e
- utilização da biomassa de planta pré-tratada com amônia para estimular o crescimento e/ou promover a síntese de enzima em um microorganismo produtor de enzima.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a biomassa de planta pré-tratada por amônia contém solúveis e/ou sólidos que estimulam o crescimento e/ou promovem a síntese de enzima celulase no microorganismo que produz enzima.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a extração de pelo menos uma porção dos solúveis da biomassa de planta tratada com amônia com um solvente para produzir um extrato solúvel e uma biomassa pré-tratada por amônia extraída.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o extrato solúvel é usado para estimular o crescimento e/ou promover a síntese de enzima celulase em um microorganismo que produz enzima.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que uma porção da biomassa pré-tratada por amônia extraída é usada para estimular o crescimento ou promover a síntese de enzima celulase em um microorganismo que produz enzima.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o método é realizado em uma instalação de produção de bioproduto que utiliza a biomassa de planta pré-tratada por amônia para

produzir um bioproduto em uma unidade de produção de bioproduto.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o microorganismo que produz enzima está contido dentro de uma unidade de produção de enzima que opcionalmente compreende o extrato solúvel, a biomassa pré-tratada por amônia extraída e/ou um subproduto que contém nutrientes da unidade de produção de bioproduto.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a enzima produzida pelo microorganismo que produz enzima é uma enzima sacarolítica.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a enzima sacarolítica é selecionada a partir de exoglucanases, endoglucanases, β -xilosidases, endoxilanases, α -arabinofuranosidases, proteína 2 induzida por celulose, α -arabinofuranosidases, acetil xilano esterases, α -glucuronidases, endoxilanases, poligalaturonases, α -galactosidases, acetil esterases, e combinações destes.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o microorganismo que produz enzima é selecionado a partir de levedura, bactéria, fungos e combinações destes.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o microorganismo que produz enzima é selecionado a partir de *Trichoderma reesei*, *A. Awamori*, *Clostridium thermocellum* e *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o extrato solúvel compreende proteínas, vitaminas, açúcares simples, oligossacarídeos, lipídeos, oligoelementos ou combinações destes.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o solvente é água.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado

pelo fato de que o solvente é uma solução de hidróxido de amônia alcalina aquosa.

15 15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a solução de hidróxido de amônia alcalina aquosa compreende cerca de 0,01% a 30% em peso de NH_4OH .

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a solução de hidróxido de amônia alcalina aquosa tem um pH entre cerca de 7 e 12.

10 17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das uma ou mais plantas é uma monocotiledônea.

15 18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a monocotiledônea é grama, palha de milho, sorgo, bagaço de cana-de-açúcar, trigo, arroz, milho, ou uma combinação destes.

19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a grama é *switchgrass*, *miscanthus*, grama junco-de-canário, ou uma combinação destes.

20 20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a biomassa de planta é palha de milho.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o extrato solúvel é usado para estimular o crescimento em um microorganismo que produz enzima.

25 22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o pré-tratamento de amônia compreende expansão de fibra por amônia.

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente hidrolisar a biomassa de planta

pré-tratada por amônia com uma enzima para gerar uma pasta de hidrolisado enzimático, em que a enzima é uma enzima secretada pelo microorganismo que produz enzima, está presente dentro do extrato solúvel, e/ou está presente dentro da biomassa pré-tratada por amônia extraída.

5 24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente processar mecanicamente a pasta de hidrolisado enzimático para produzir um hidrolisado enzimático líquido que compreende uma mistura de açúcar fermentável.

 25. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 24,
10 caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente fermentar o hidrolisado enzimático líquido para gerar um bioproduto.

 26. BIOPRODUTO, caracterizado pelo fato de que é produzido de acordo com o método conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 25.

 27. BIOPRODUTO, de acordo com a reivindicação 26,
15 caracterizado pelo fato de que compreende um químico de base biológica ou um biocombustível.

 28. SISTEMA, caracterizado pelo fato de que compreende:
uma instalação de produção de biocombustível que contém:

 uma unidade de produção de bioproduto configurada para
20 produzir um bioproduto e um subproduto que contém nutriente a partir da biomassa pré-tratada com amônia; e

 uma unidade de produção de enzima em comunicação com a unidade de produção de bioproduto e configurada para produzir uma enzima a partir do bioproduto que contém nutriente e/ou solúvel extraído a partir da
25 biomassa pré-tratada por amônia para uso na unidade de produção de bioproduto.

 29. SISTEMA, conforme descrito na reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o bioproduto é um biocombustível ou

bioquímico.

30. SISTEMA, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o biocombustível é etanol e a biomassa pré-tratada por amônia é palha de milho pré-tratada por amônia.

5 31. MÉTODO PARA PRODUZIR UM BIOPRODUTO, caracterizado pelo fato de que compreende:

- produção de uma enzima em uma unidade de produção de enzima que compreende um microorganismo que produz enzima, um resíduo de produção de etanol e/ou um estimulante extraído a partir de uma biomassa
10 pré-tratada por amônia; e

- fornecimento da enzima a uma unidade de produção de bioproduto em que o bioproduto é produzido.

32. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a biomassa pré-tratada por amônia é palha de
15 milho tratada por amônia.

33. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o resíduo de produção de etanol é um bioproduto que contém nutriente gerado na unidade de produção de bioproduto.

20 34. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o resíduo de produção de etanol é licor de xarope de milho.

35. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o estimulante contém solúveis capazes de
25 estimular o crescimento microbiano.

36. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o estimulante contém solúveis capazes de estimular ou induzir a produção de enzima no microorganismo que produz

enzima.

37. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a unidade de produção de enzima compreende adicionalmente uma biomassa pré-tratada diluída.

5 38. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o microorganismo que produz enzima é selecionado a partir de *Trichoderma reesei*, *A. Awamori*, *Clostridium thermocellum* e *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*.

39. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31,
10 caracterizado pelo fato de que a enzima produzida é uma enzima sacarolítica.

40. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a enzima sacarolítica é selecionada a partir de exoglucanases, endoglucanases, β -xilosidases, endoxilanases, α -arabinofuranosidases, proteína 2 induzida por celulose, α -
15 arabinofuranosidases, acetil xilano esterases, α -glucuronidases, endoxilanases, poligalaturonases, α -galactosidases, acetil esterases, e combinações destes.

41. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o bioproduto é um bioquímico ou biocombustível.

20 42. ESTIMULANTE, caracterizado pelo fato de que compreende:

um extrato solúvel a partir de uma biomassa de planta pré-tratada por amônia; e

uma biomassa de planta pré-tratada por amônia extraída, em que
25 o extrato solúvel e a biomassa de planta pré-tratada por amônia extraída podem estimular o crescimento e/ou promover a síntese de enzima em um microorganismo que produz enzima.

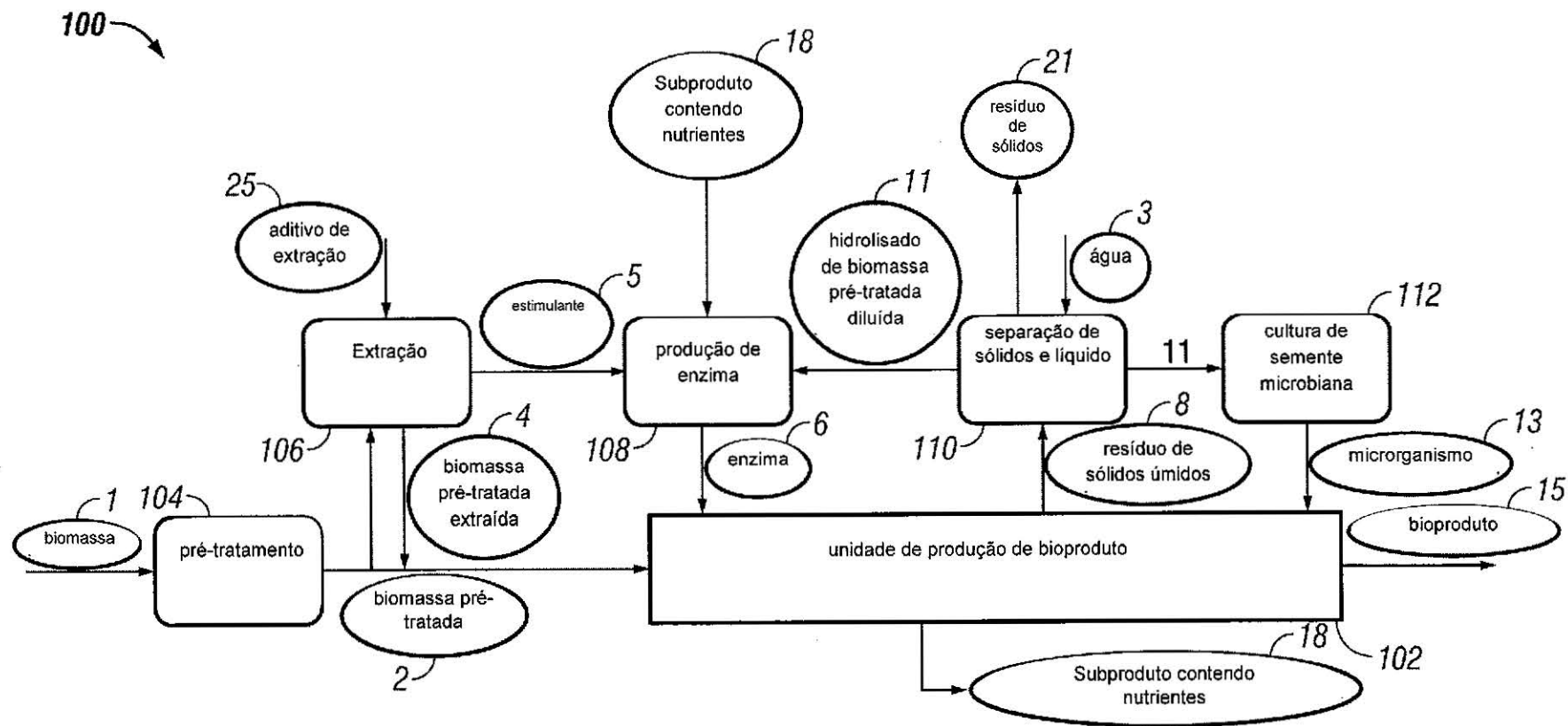


Fig. 1A

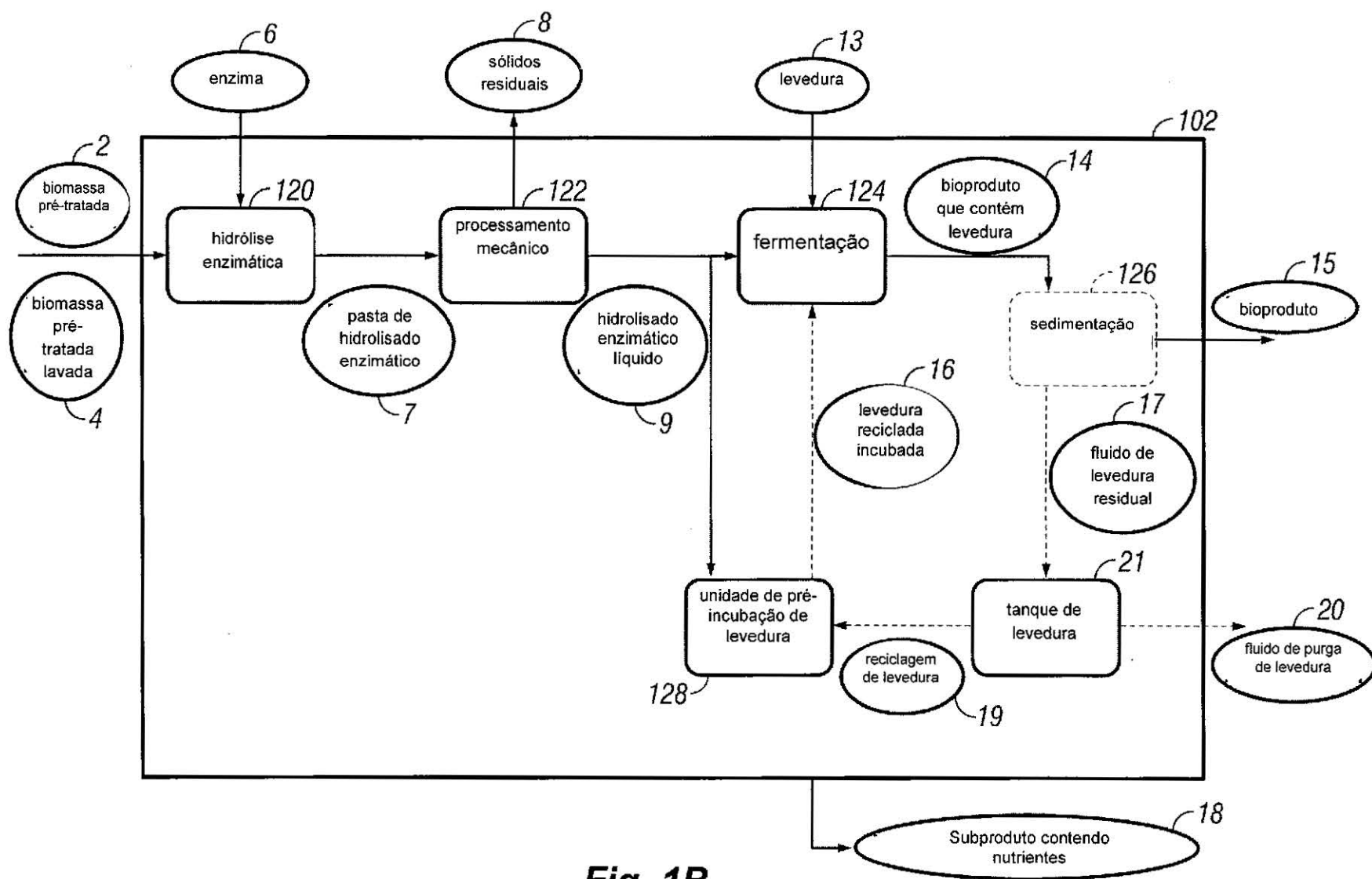
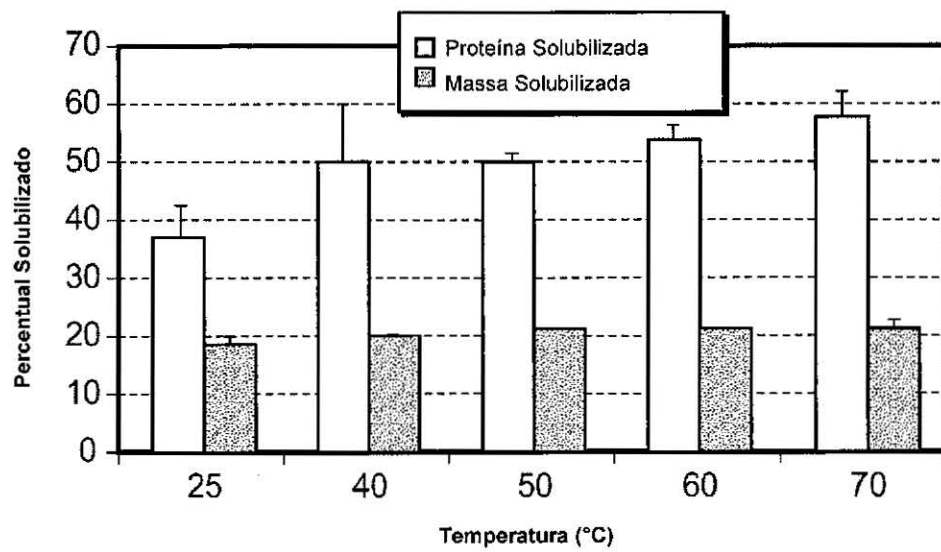
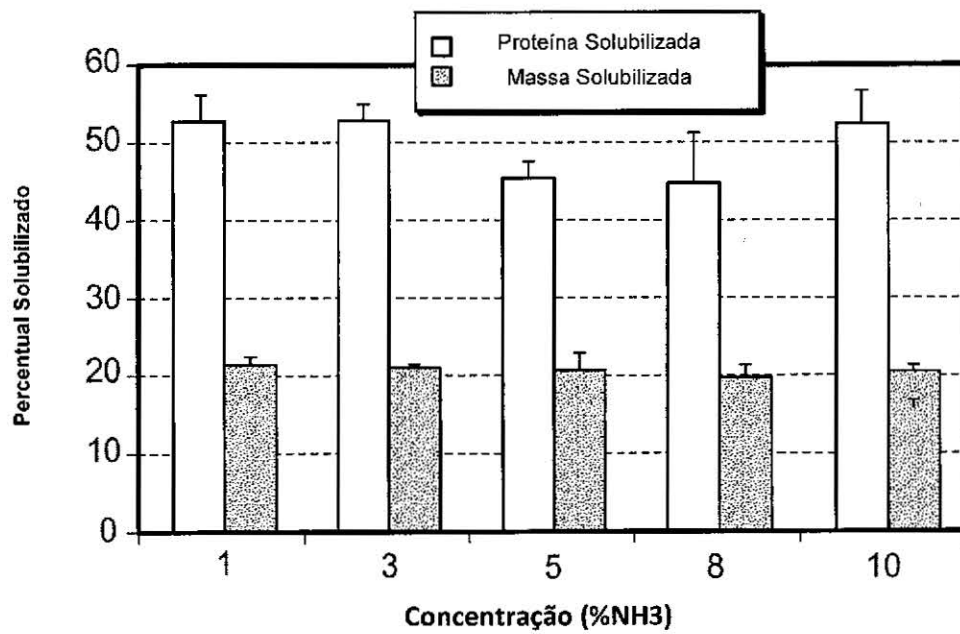


Fig. 1B

**Fig. 2A****Fig. 2B**

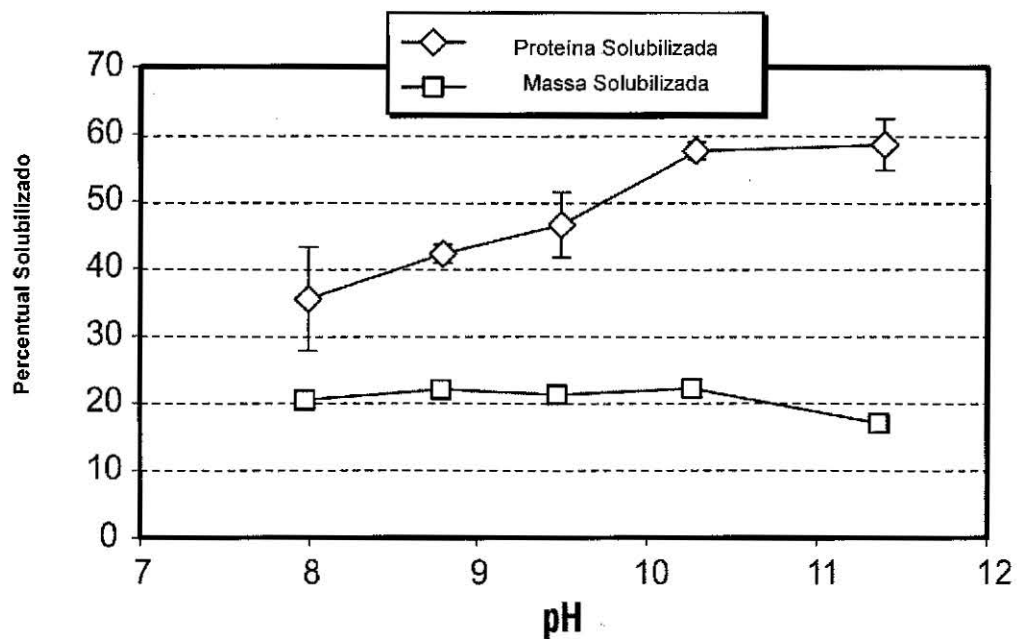


Fig. 3A

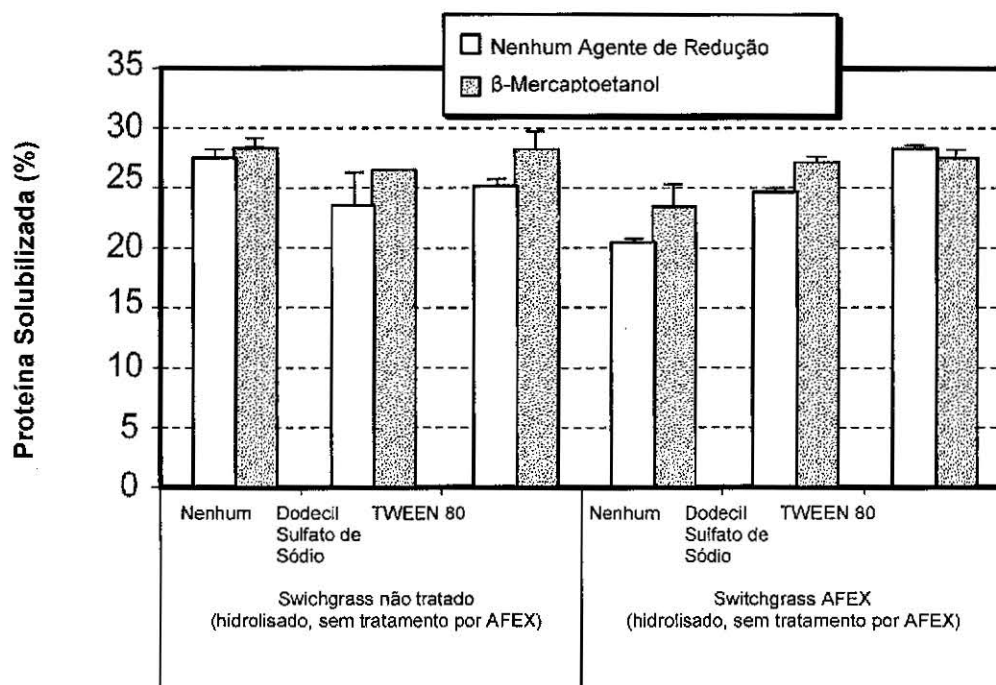


Fig. 3B

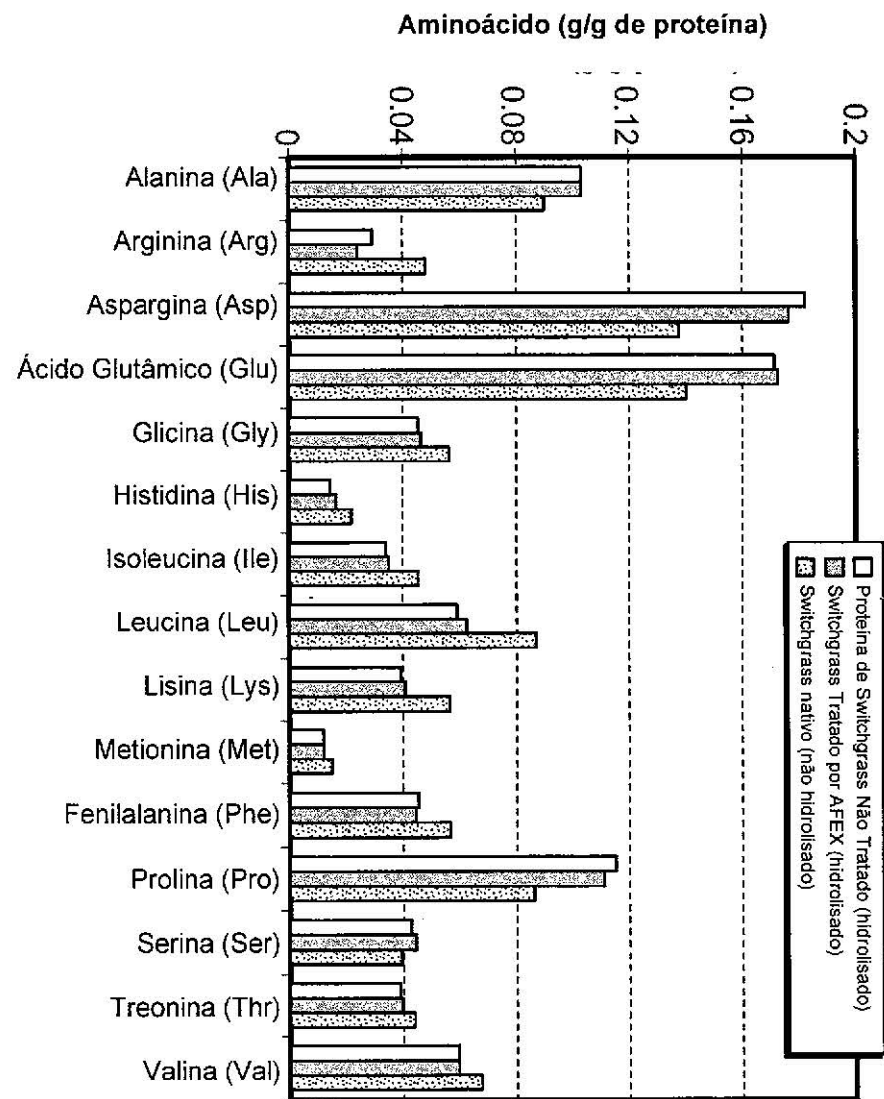


Fig. 4

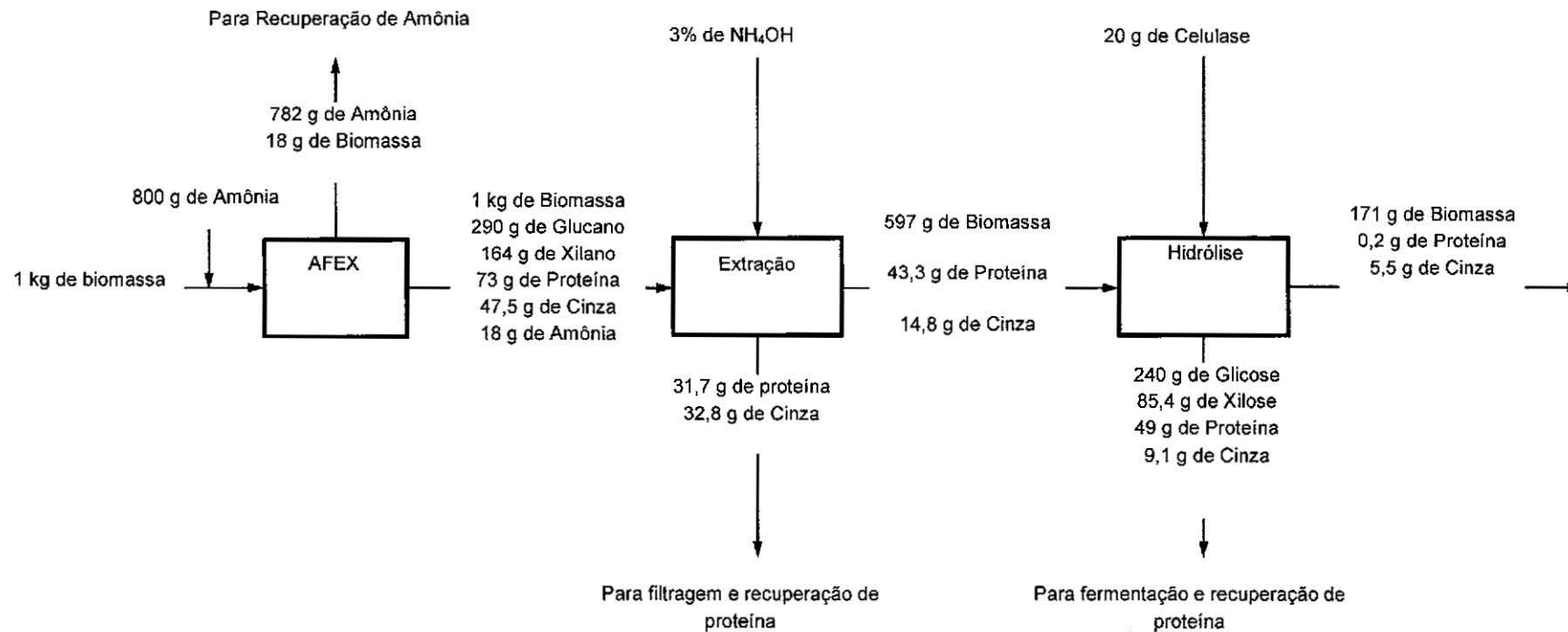


Fig. 5

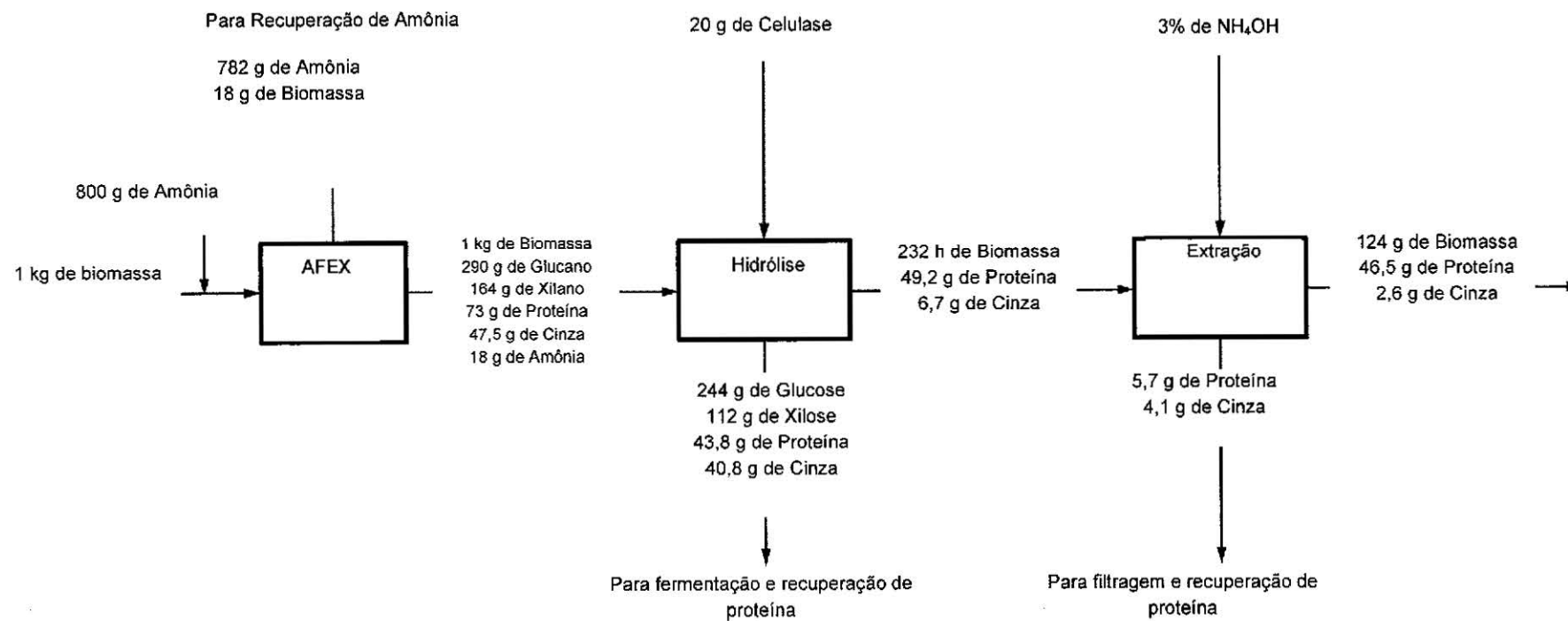
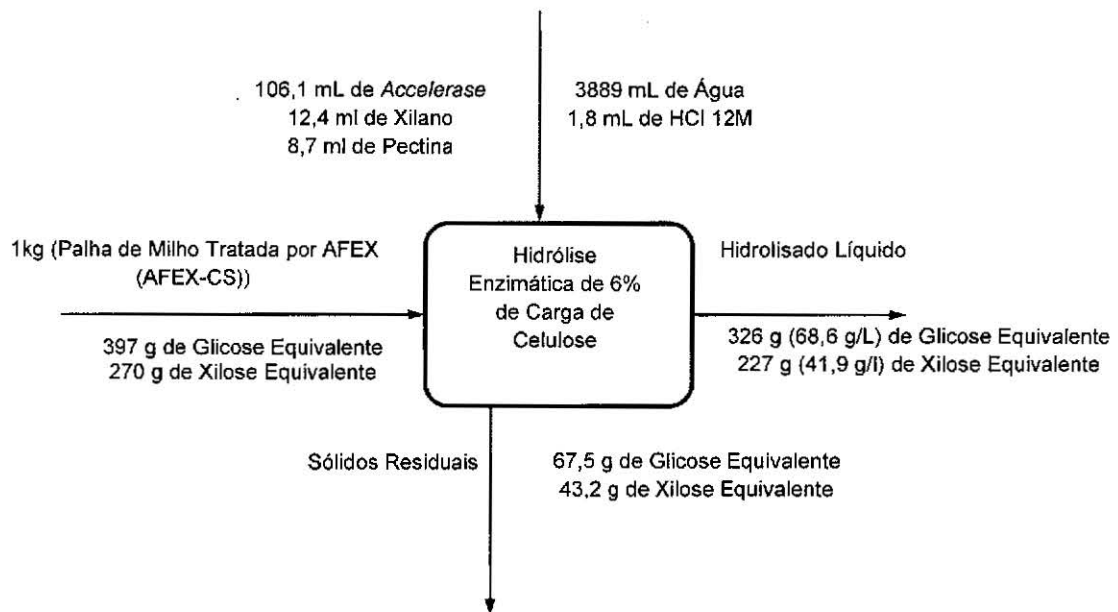
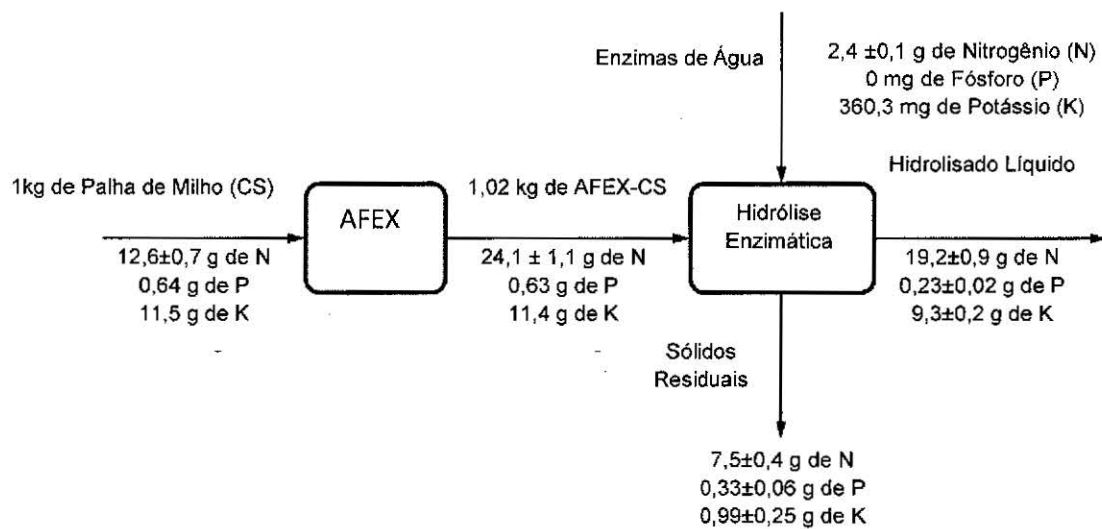


Fig. 6

**Fig. 7****Fig. 8**

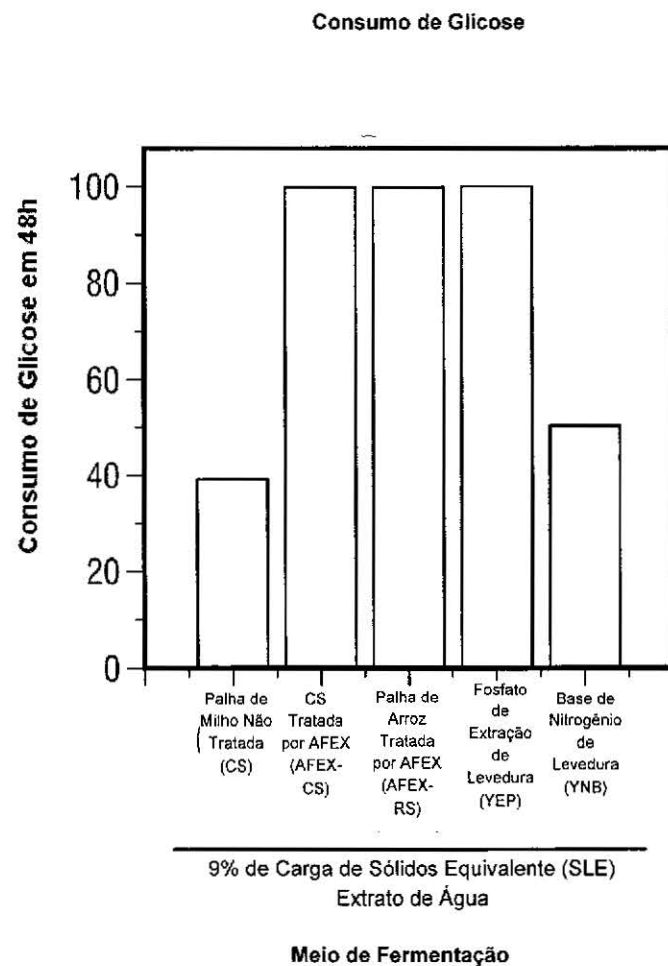


Fig. 9A

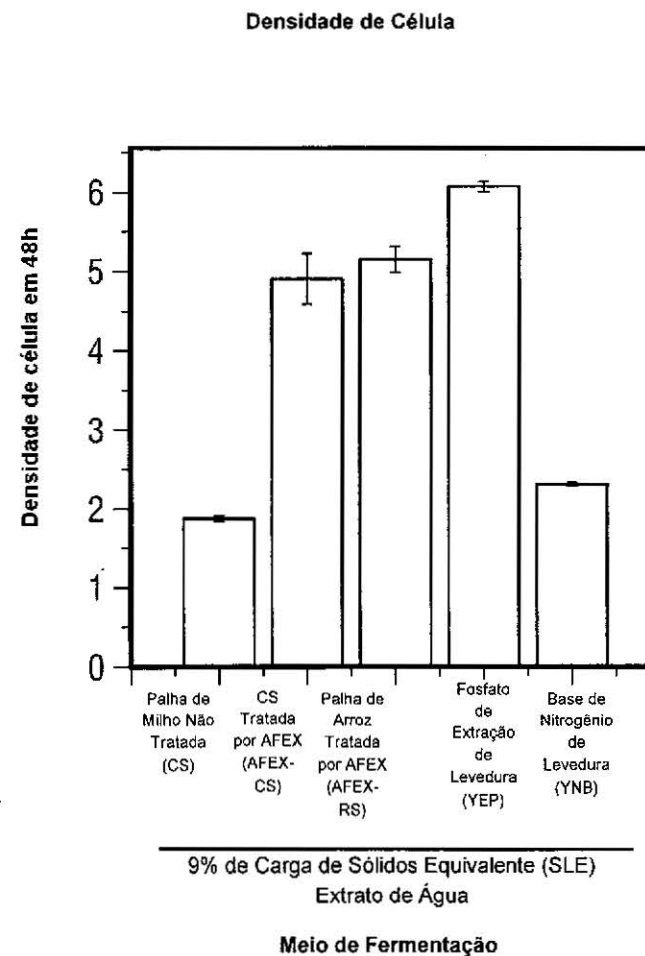
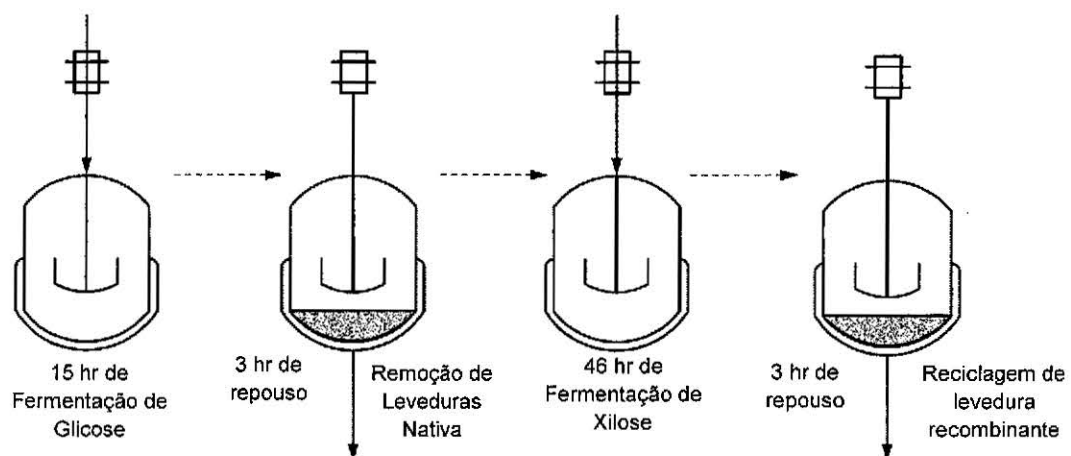
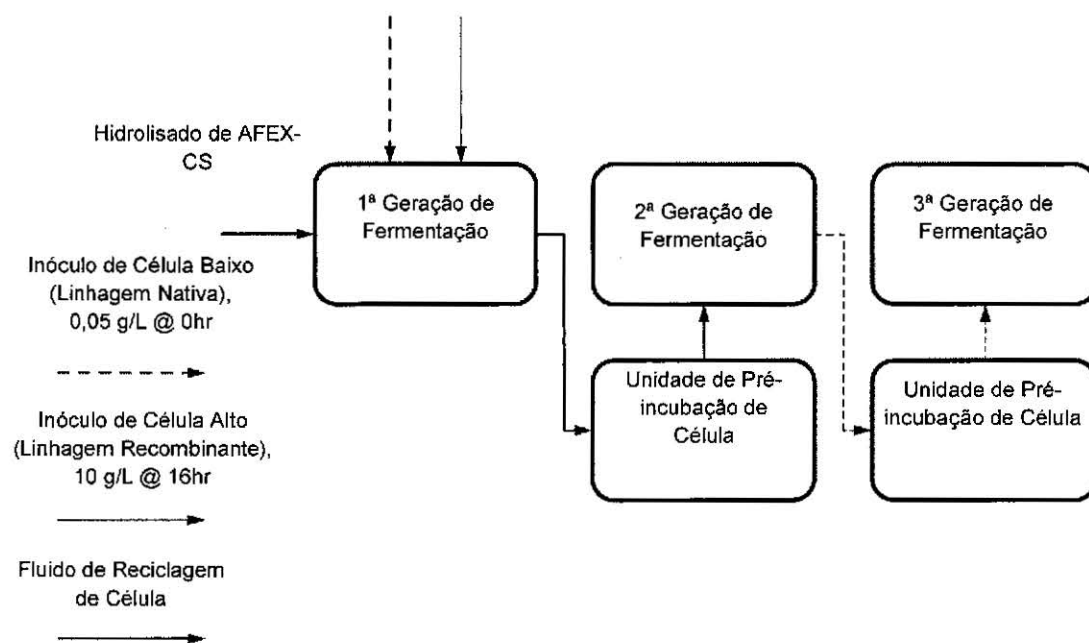


Fig. 9B

**Fig. 9C****Fig. 9D**

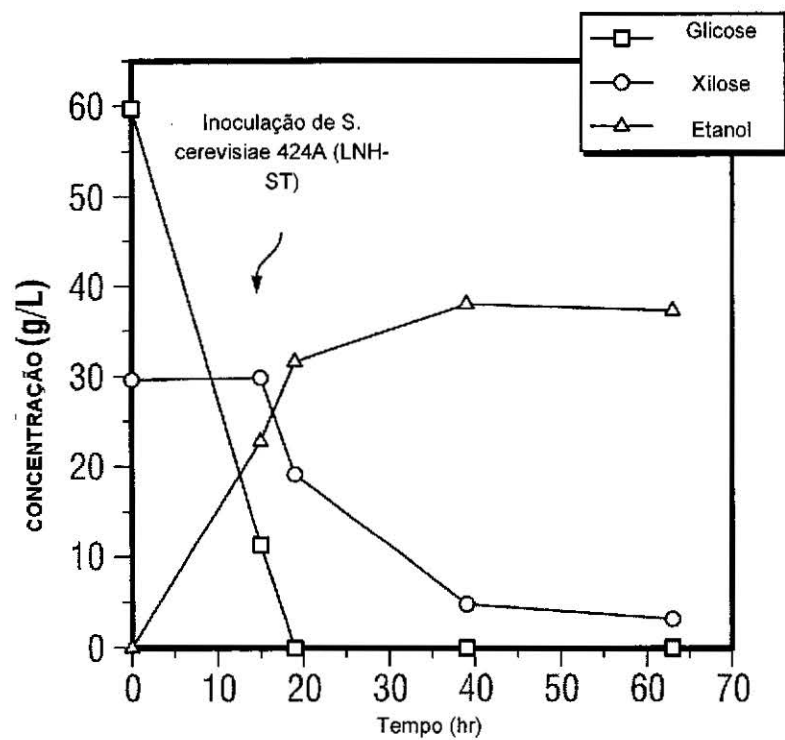


Fig. 10A

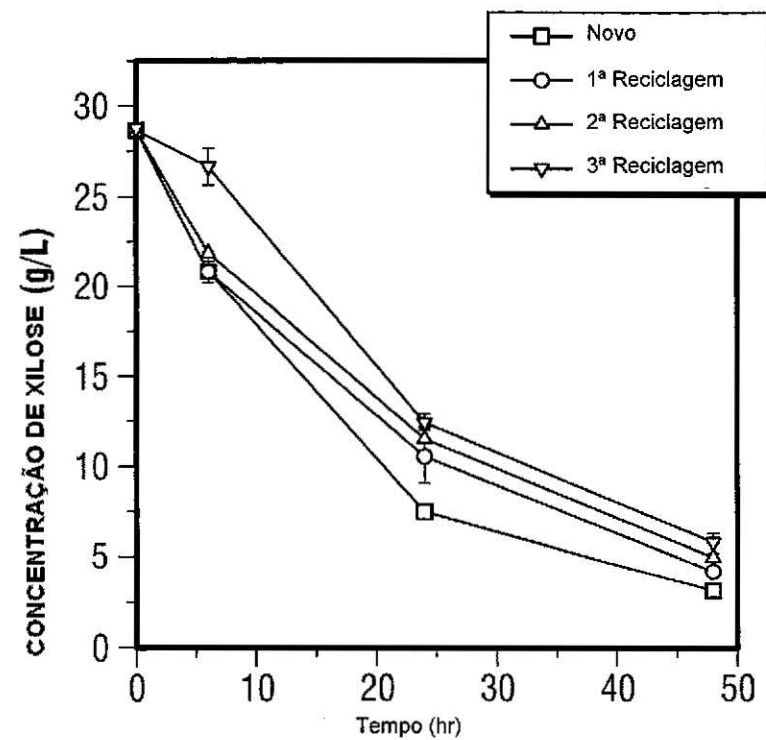
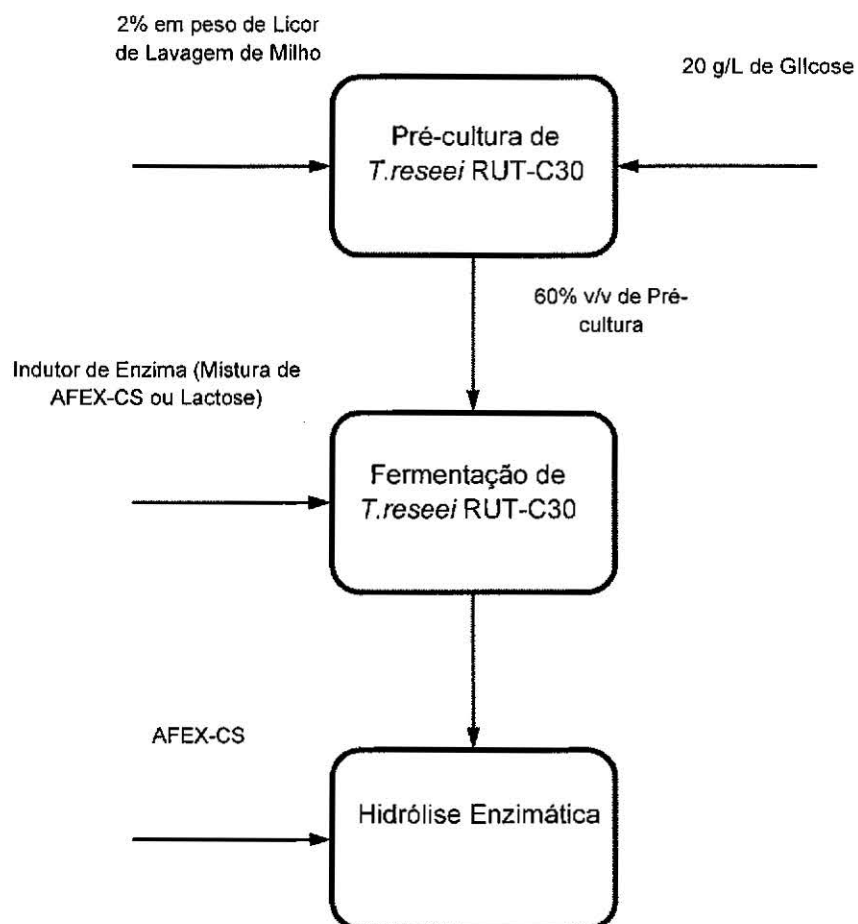


Fig. 10B

**Fig. 11A**

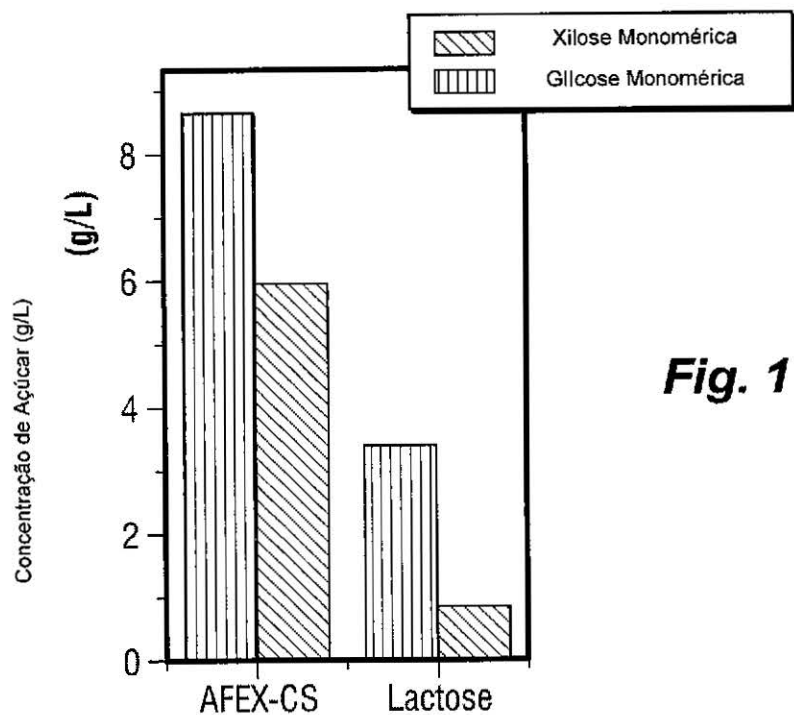
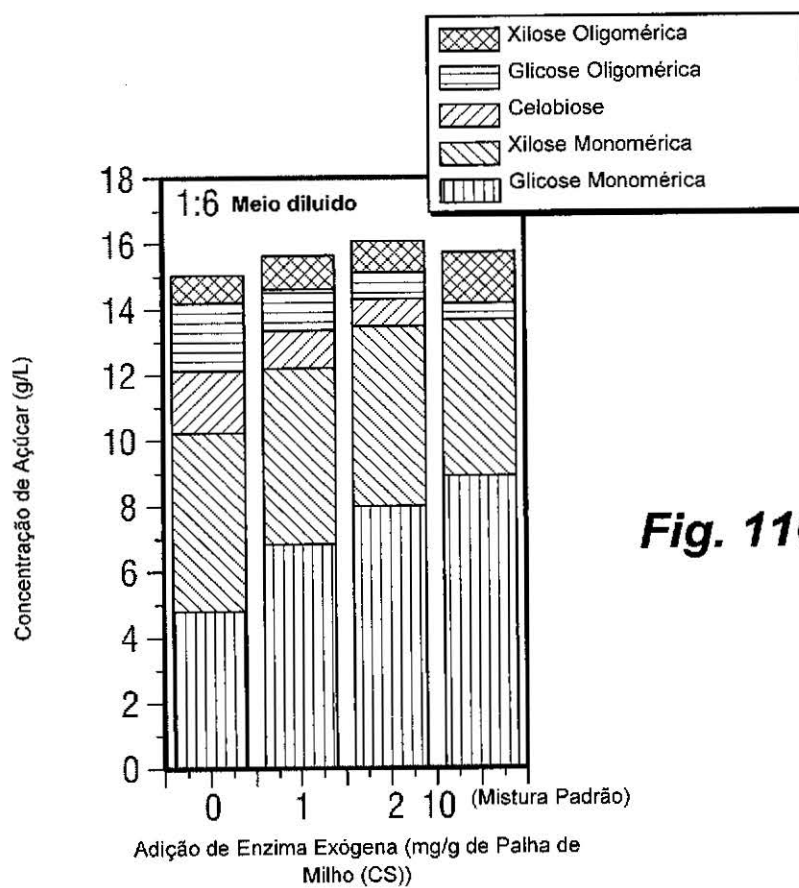
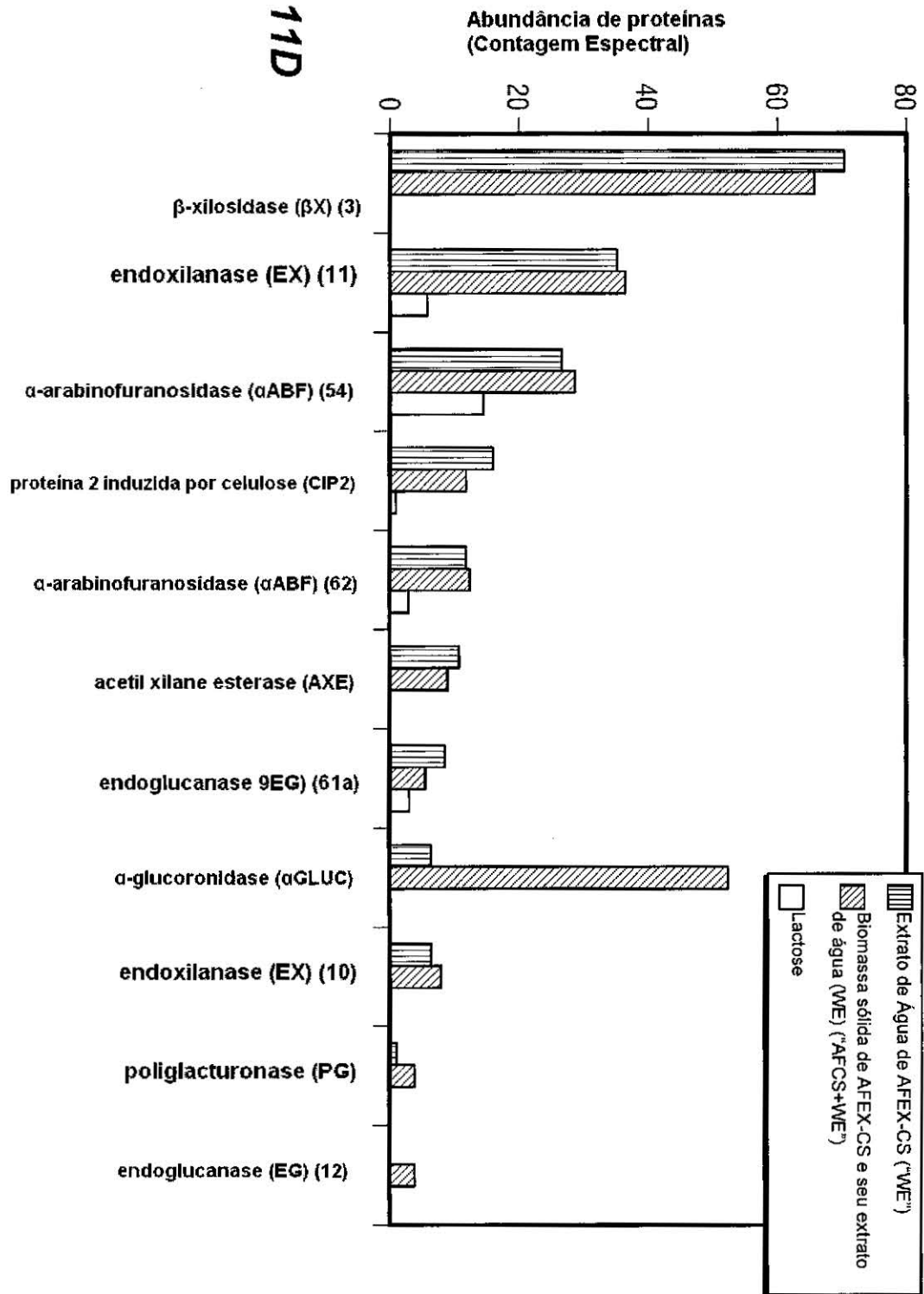
**Fig. 11B****Fig. 11C**

Fig. 11D



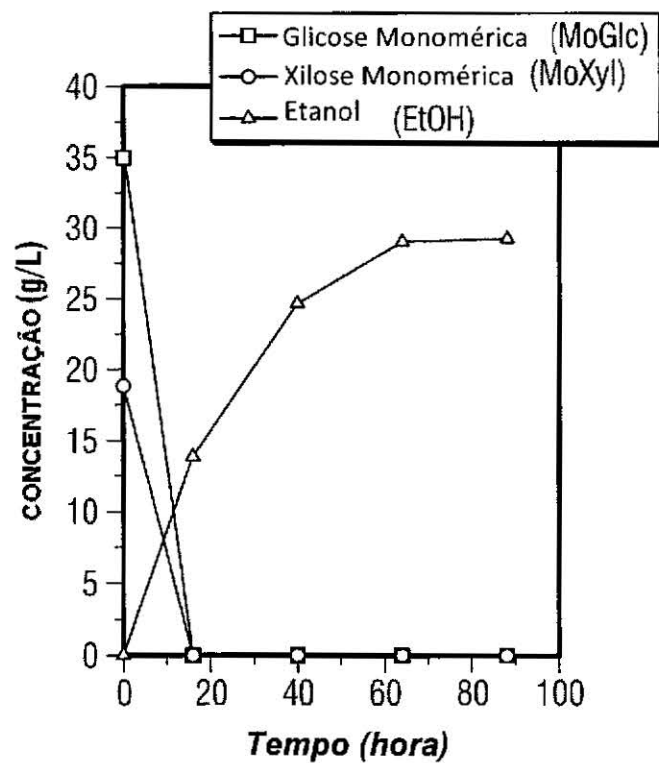


Fig. 12A

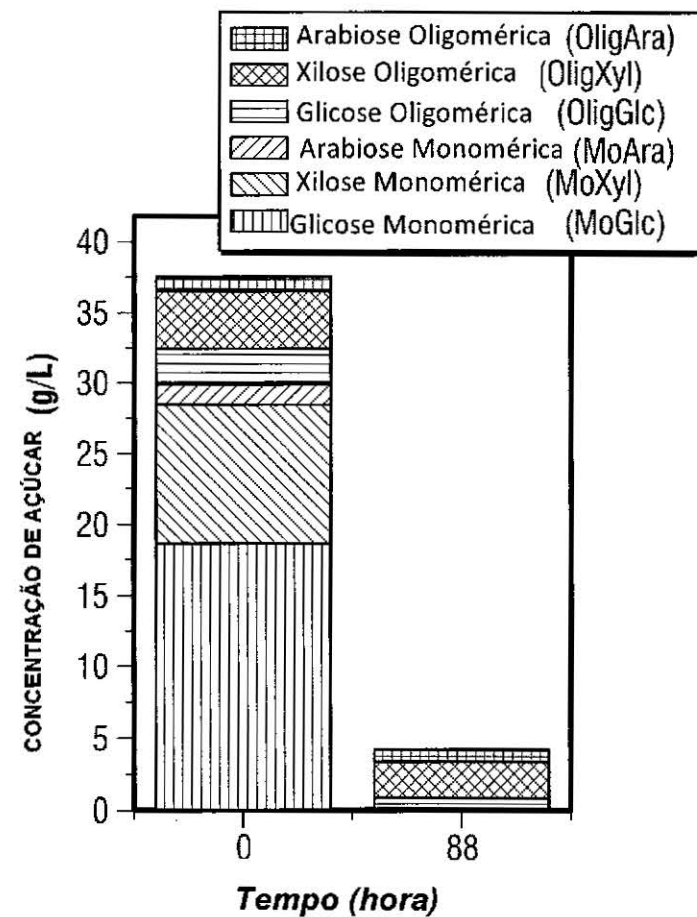


Fig. 12B

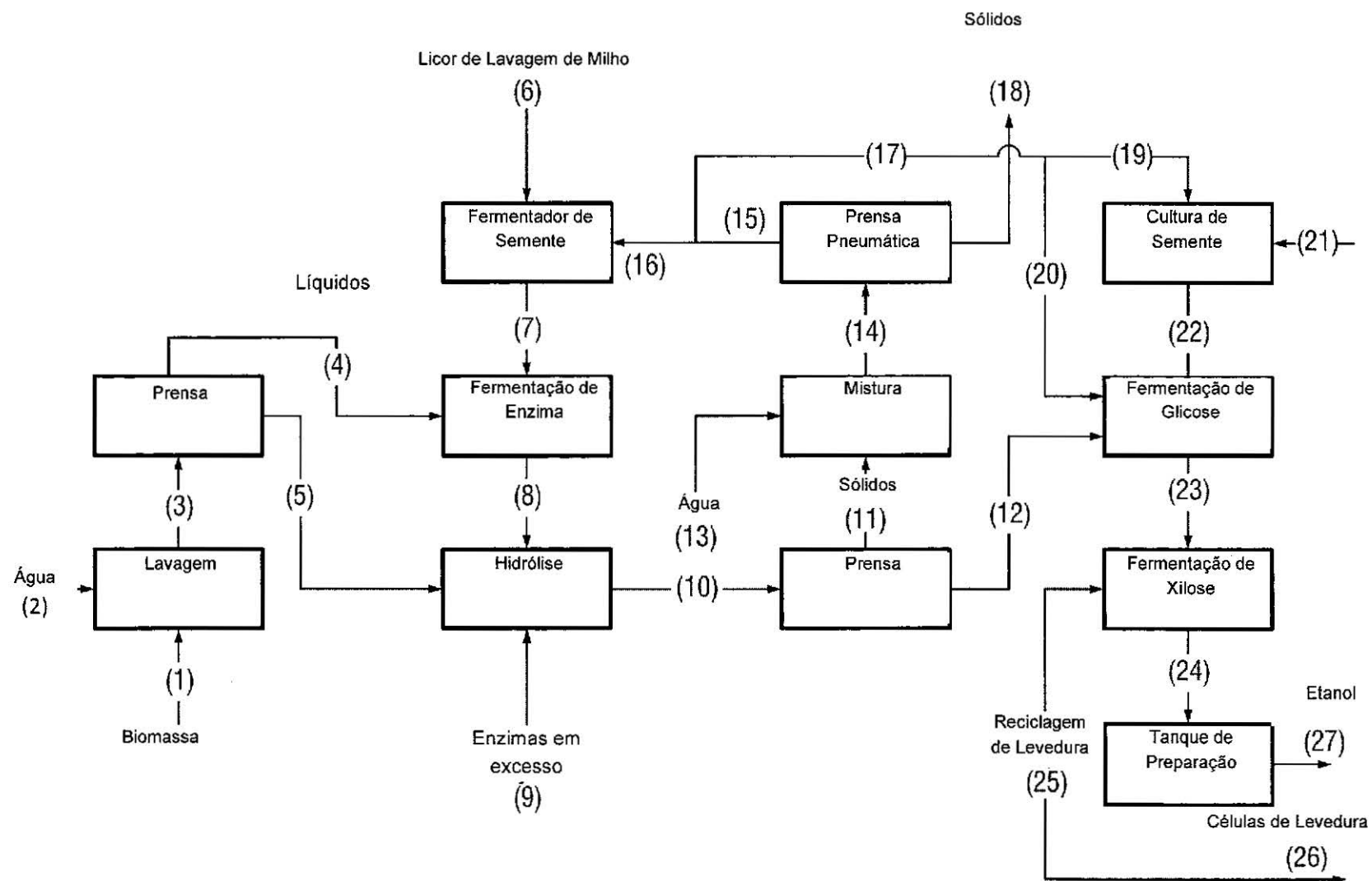


Fig. 13

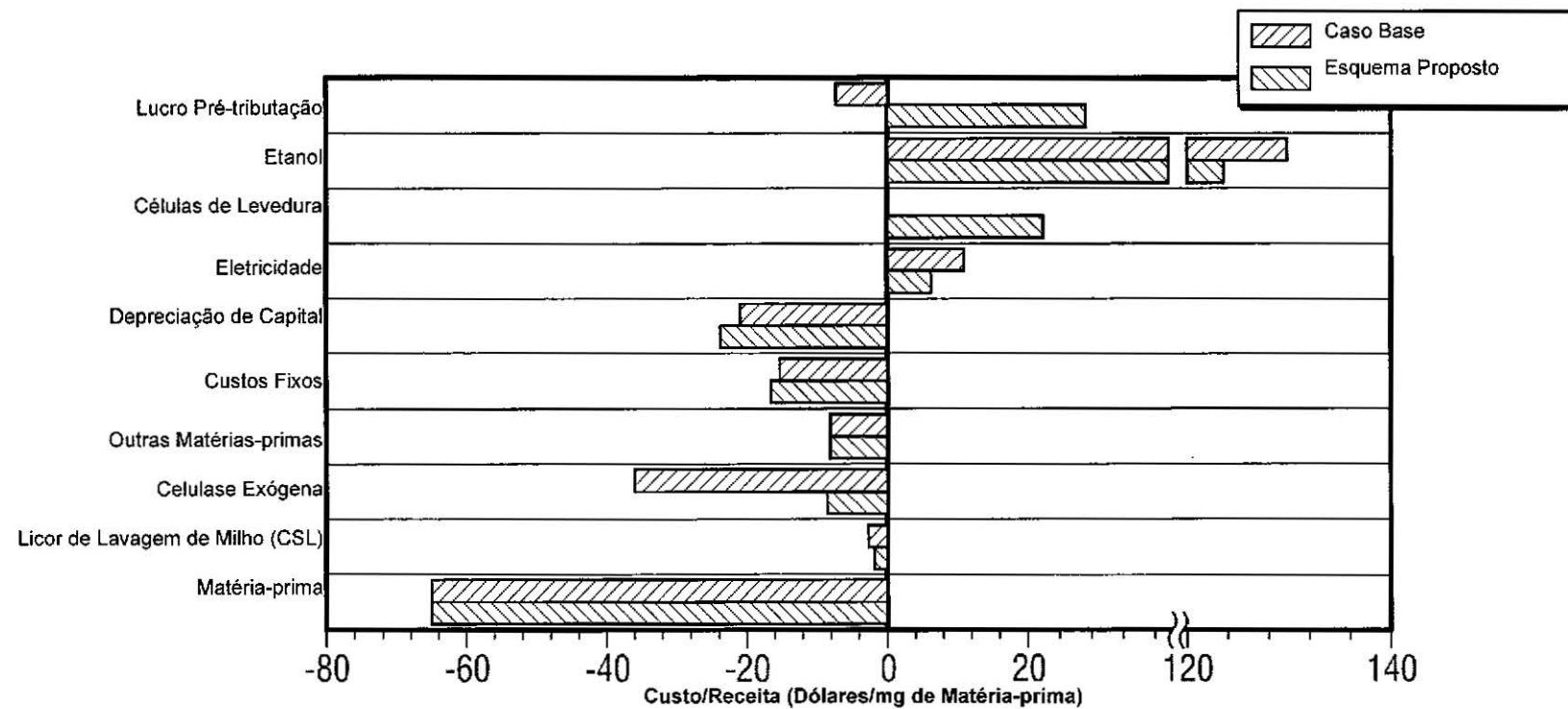
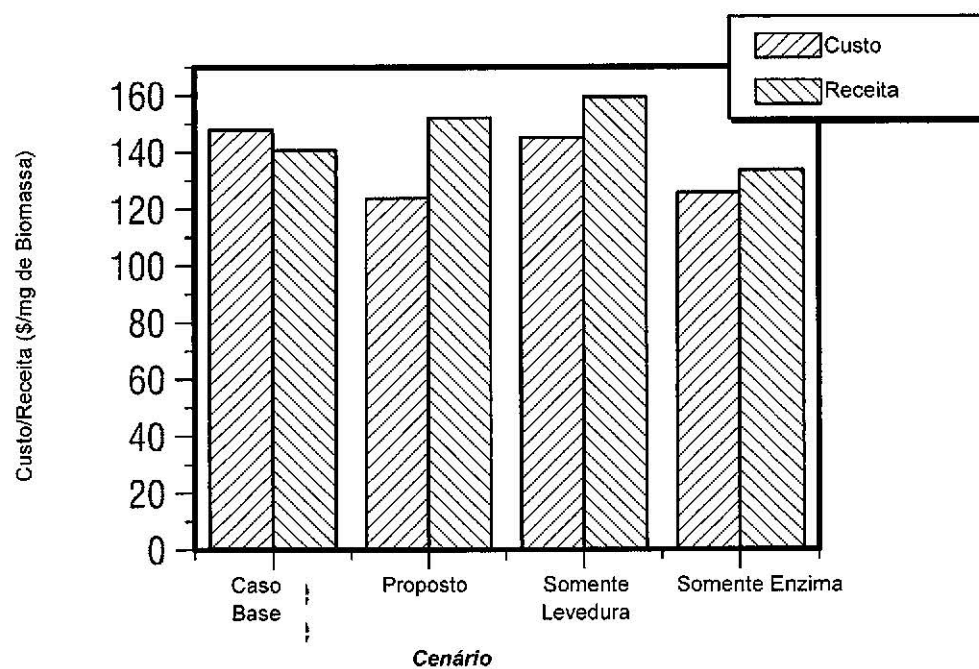


Fig. 14A

**Fig. 14B**

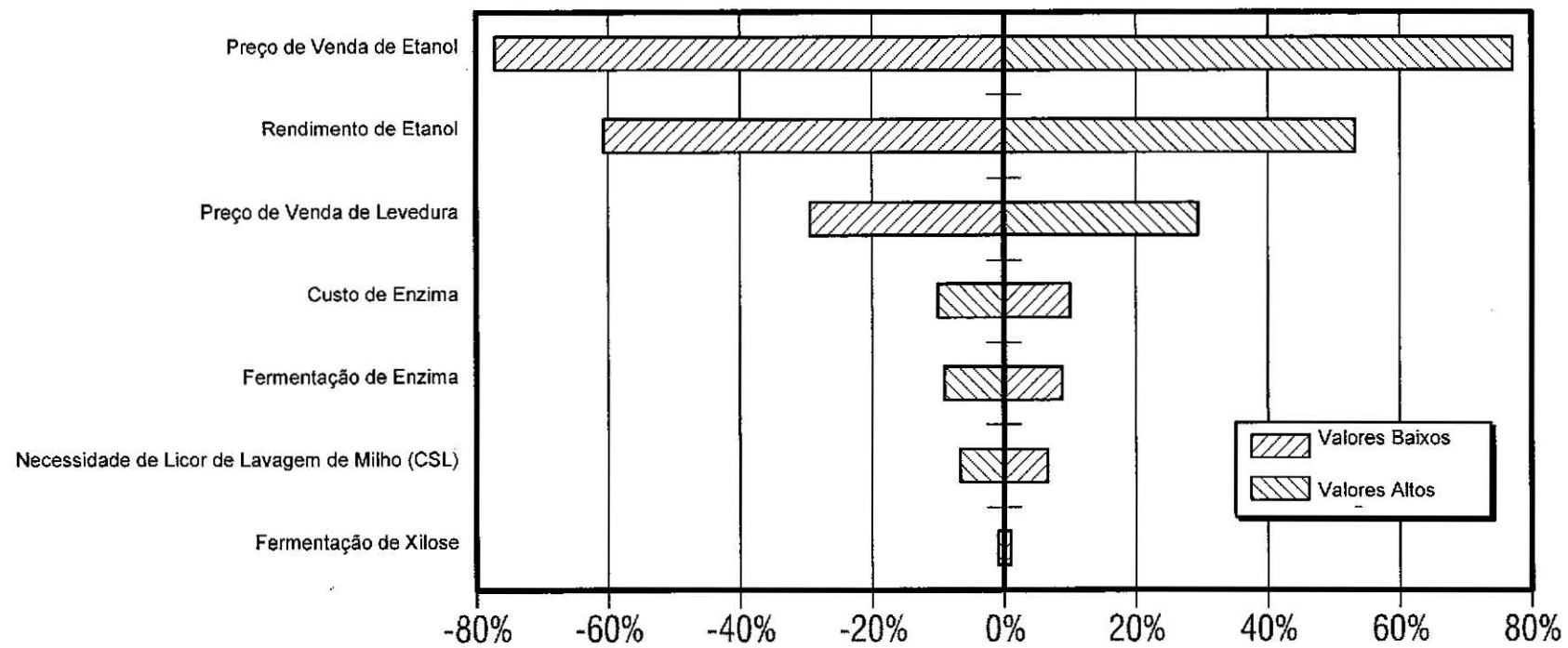


Fig. 14C

RESUMO**“MÉTODO, BIOPRODUTO, SISTEMA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM
BIOPRODUTO E ESTIMULANTE”**

5 A presente invenção trata de métodos para tratar a biomassa de
planta com amônia para fornecer uma biomassa de planta pré-tratada com
amônia e usar a biomassa de planta pré-tratada com amônia para estimular o
crescimento ou promover a síntese de enzima e um microorganismo produtor
de enzima. O processo pode ser econômica e eficientemente realizado em
uma instalação de produção de bio-produto.