



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

**(11) PI 0720728-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 17/12/2007**

**(45) Data de Concessão: 23/01/2018**

**(54) Título:** MÉTODO PARA CULTIVAR UM MICRO-ORGANISMO DE PRODUÇÃO QUE PRODUZ UMA PROTEÍNA DESEJADA

**(51) Int.Cl.:** C12N 1/22; C12P 21/00; C12N 9/02; C12N 9/42; C12R 1/885

**(30) Prioridade Unionista:** 03/01/2007 US 60/878,616

**(73) Titular(es):** DANISCO US INC., GENENCOR DIVISION

**(72) Inventor(es):** ELIZABETH A. BODIE; GEORGE ENGLAND

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA CULTIVAR UM MICRO-ORGANISMO DE PRODUÇÃO QUE PRODUZ UMA PROTEÍNA DESEJADA".

1. Referência Cruzada A Pedido Relacionado

5 O presente pedido reivindica o benefício de e prioridade em relação ao pedido de patente provisório de número de série 60/878.616, intitulado "Condicionamento de Biomassa para Crescimento Microbiano", depositado em 03 de janeiro de 2007, aqui incorporado por referência em sua totalidade.

2. Suporte Governamental

10 Partes deste trabalho tiveram por fundamento o Subcontrato de número ZCO-30017-01 com o *National Renewable Energy Laboratory* sob o Contrato Primário de número DE-AC36-99GO10337 com o *U.S. Department of Energy*. Consequentemente, o Governo do Estados Unidos pode ter certos direitos nesta invenção.

15 2. Introdução

A presente invenção refere-se a um método para o aperfeiçoamento do rendimento de processos microbianos que usam biomassa de lignocelulose com uma fonte de nutriente.

3. Antecedentes da Invenção

20 Em anos recentes, avanços consideráveis foram feitos na conversão de biomassa em etanol como combustível. A maior parte do etanol produzido a partir de biomassa, até agora, baseia-se em fermentação de glicose de milho, nos Estados Unidos, e em sacarose de açúcar de cana, no Brasil. A biomassa, que grandemente consiste em celulose, hemicelulose e 25 lignina tem atraído atenção crescente como uma importante fonte de energia renovável. Resíduos de floresta e de agricultura são abundantes e relativamente baratos. Se esse material, ou pelo menos uma parte significativa dele, pudesse ser convertido em combustível líquido, isto constituiria uma contribuição significativa para solucionar o problema da reciclagem e da conservação de recursos.

30 O etanol pode ser produzido a partir de materiais de lignocelulósicos, tais como resíduos de madeira e culturas. Os componentes de celul-

se e de hemicelulose de lignocelulose podem ser hidrolisados para liberar monossacarídeos, que, então, são fermentados para formar metanol. Entretanto, tem sido difícil de desenvolver um processo economicamente viável de conversão de material celulósico em açúcares fermentáveis. A pesquisa 5 sobre o uso de biomassa de lignocelulose para preparar etanol e outros produtos é amplamente revista, ver, por exemplo, Lin e Tanaka (2006 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:627-642) e Saha (2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:279-291).

A lignocelulose é um substrato mais complexo do que amido e 10 açúcares. Uma das tarefas limitantes de velocidade e difíceis é a remoção de lignina. Além disso, os tecidos vegetais diferem tremendamente com respeito ao tamanho e à organização. Alguns tipos de células vegetais têm paredes celulares espessas e lamelas intermediárias altamente significadas separando as células umas das outras. Essas paredes celulares têm que ser 15 atacadas a partir da superfície luminal, para fora, através da parede secundária (de maneira contrária a partículas de celulose pura, que são degradadas a partir de fora para dentro). Em adição às limitações impostas pela estrutura da própria celulose, limitações adicionais são impostas por difusão e transporte do agente celulolítico para o sítio de ataque. Portanto, antes da 20 hidrólise de celulose, a maioria dos materiais de madeira são submetidos a um pré-tratamento para tornar as fibras de celulose, dentro das estruturas, mais cômodas e acessíveis à hidrólise.

Observou-se que a fermentação de hidrolisados derivados de 25 madeira para formar etanol é dificultada pela presença de substâncias inibidoras, tais como furanos, ácido orgânico e vários compostos fenólicos. Tais compostos inibidores são formados ou liberados durante a degradação de lignina e a hidrólise dos polissacarídeos complexos na madeira. O tipo de compostos tóxicos e sua concentração em hidrolisados de lignocelulose dependem tanto da matéria-prima quanto das condições operacionais empregadas para a hidrólise. Tais compostos tóxicos podem reduzir de maneira significativa a utilização eficiente de açúcares e a produção de etanol.

Inúmeros processos de detoxificação biológicos, físicos e quími-

cos têm sido testados com hidrolisados de biomassa de abeto (Larsson et al., 1999, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79, 91-103). A patente norte-americana de número 7.067.303 descreve o uso do fungo *Coniochaeta lignaria* para remover furanos em hidrolisados. Um método comumente usado, 5 conhecido como "overliming" envolve o ajuste do pH inicialmente para 10-11 com um álcali, por exemplo, hidróxido de cálcio ou amônia, e, então, para 5,0-6,0 com um ácido, por exemplo, ácido sulfúrico ou fosfórico. As condições usadas para a detoxificação com álcali têm que ser cuidadosamente controladas para otimizar os efeitos positivos e para minimizar a degradação 10 de açúcares fermentáveis. Os mecanismos por trás do efeito de detoxificação com álcalis e a influência da escolha de cátion e das condições não são bem entendidos. (Nilvebrant et al., 2003, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105-108;615-28; Persson et al., 2002, *J. Agric. Food Chem.* 50(19):5318-25). Embora o "overliming" seja muito eficaz, ele resulta em um precipitado insolúvel que persiste através de etapas subsequentes e tem que ser removido e 15 descartado, resultando em resíduos e custo aumentado.

A eficácia de um método de detoxificação é variável porque cada tipo de hidrolisado tem um grau de toxicidade diferente, e cada espécie ou mesmo cepa de micro-organismo tem um diferente grau de tolerância a inibidores. Portanto, diferentes métodos de detoxificação não podem ser comparados de maneira estrita, quando hidrolisados de diferentes fontes e de diferentes micro-organismos forem usados. (Mussatto e Roberto, 2004, *Bioresour. Technol.* 93(1):1-10; Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000, *Bioresour. Technol.* 74:25-33; Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000, *Bioresour. Technol.* 74:17-24).

Enquanto o foco de muito da pesquisa está direcionado a detoxificação de hidrolisados de madeira para fermentação etanólica, o uso de biomassa de lignocelulose como matéria-prima para outros processos biotecnológicos está praticamente inexplorado. Por exemplo, devido à demanda 30 aumentada por enzimas de celulase em uma variedade de indústrias, claramente existe uma necessidade de novos métodos para aumentar a produção de celulase a partir de fungos, por exemplo, *Trichoderma reesei*, tal que

enzimas de celulase possam estar mais economicamente disponíveis.

Mesmo dentro do contexto de geração de etanol, existe uma necessidade urgente de aperfeiçoamento na economia e na eficiência das várias diferentes abordagens na conversão de lignocelulose para formar açú-

5       cares para formar etanol.

#### 4. Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a métodos para o aperfeiçoamento do rendimento de processos microbianos, que usem biomassa de lignocelulose como uma fonte de nutriente. Em particular, a invenção fornece méto-

10       dos para preparar uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose que está condicionada para crescimento microbiano. Uma tal composição pode ser usada como um componentes em uma alimentação para um processo microbiano. Os métodos compreendem a colocação em contato de

15       uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose com uma composição de enzima que compreenda uma enzima oxidante de fenol, durante um período de tempo suficiente para neutralizar os compostos inibidores

presentes na composição. A composição condicionada pode suportar uma velocidade de crescimento de uma espécie de micro-organismo de produ-

ção, que é mais elevada do que aquela que pode ser obtida com uma composição de biomassa de lignocelulose que não foi colocada em contato com

20       a composição de enzima. Em uma concretização, a composição de enzima compreende uma lacase. Em uma concretização, a biomassa de lignocelulose é derivada a partir de plantas de não-madeira, tais como milho e/ou cana-de-açúcar. Em uma concretização, a composição de enzima compreende

25       am lacase e a biomassa de lignocelulose é selecionada a partir de caules, folhas e outras partes de milho e bagaço de cana-de-açúcar.

A invenção também engloba métodos para o cultivo de micro-organismos que sejam sensíveis a certos compostos inibidores presentes em biomassa de lignocelulose. Em uma concretização, uma composição

30       compreendendo uma biomassa de lignocelulose é colocada em contato com uma composição de enzima compreendendo uma enzima oxidante de fenol, durante um período de tempo suficiente para condicionar a composição para

crescimento microbiano. A composição condicionada é, então, usada como componente da matéria-prima para crescimento dos micro-organismos. Alternativamente, a composição de enzima é adicionada diretamente a um processo, no qual os micro-organismos são cultivados em um meio de cultu-

5 ra compreendendo biomassa de lignocelulose. Em cada caso, a velocidade de crescimento dos micro-organismos e/ou do rendimento em biomassa microbiana na composição condicionada são aumentados em relação àqueles de uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose que não foi colocada em contato com a composição de enzima.

10 A invenção engloba adicionalmente métodos para produção de um produto em um micro-organismo que usa biomassa de lignocelulose como uma fonte de nutriente. Os métodos, geralmente, envolvem o cultivo de micro-organismos que produzam o produto em uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose, que esteja condicionada para crescimento 15 microbiano. O produto pode ser recuperado a partir dos micro-organismos e/ou da composição condicionada. Conforme descrito acima, a composição é condicionada por tratamento com uma enzima oxidante de fenol, de modo que a velocidade de crescimento dos micro-organismos obteníveis a partir da composição condicionada é aumentada em relação àquela de uma composição sem condicionamento. Em certas concretizações, o micro-organismo cultivado é uma espécie de *Trichoderma* e o produto é uma enzima de celulase.

20

### 5. Descrição das Figuras

Figura 1. Crescimento de culturas tratadas com lacase. O gráfico 25 mostra o consumo de glicose por cultivo de uma cultura de *Trichoderma reesei* durante um período de três dias, em um meio de cultura compreendendo inicialmente rejeitos de milho à 2% e 10 g de glicose/litro. As concentrações de glicose de várias culturas, que usaram meios de cultura tratados com as concentrações indicadas (0 U/mL, 0,125 U/mL, 0,25 U/mL, 0,5 U/mL) de lacase de *Trichoderma piluliferum* para o número de dias indicado (1, 2, 3 dias) 30 são mostrados por diferentes linhagens e símbolos de legenda. A cultura de controle não foi tratada com lacase (0 U/mL).

## 6. Descrição Detalhada Da Invenção

A presente invenção aborda o problema de substâncias inibidoras em biomassa de lignocelulose, que possam afetar de maneira adversa o desempenho de culturas microbianas que usam biomassa de lignocelulose 5 como uma fonte de nutriente. A presente invenção refere-se a métodos para o aperfeiçoamento da utilidade de biomassa de lignocelulose como uma fonte de nutriente para o crescimento de micro-organismos em vários tipos de processos.

A invenção envolve o tratamento ou o condicionamento de uma 10 biomassa de lignocelulose, conforme definido abaixo, com uma composição de enzima que compreende uma ou mais enzimas oxidantes de fenol. Sem pretender-se estar ligado a qualquer teoria ou mecanismo, alguns dos inibidores são compostos fenólicos liberados durante a decomposição de lignina e acredita-se que as enzimas oxidantes de fenol da invenção catalisam o 15 acoplamento oxidativo de tais compostos fenólicos, para formar compostos poliméricos insolúveis. O uso de enzimas oxidantes de fenol na presente invenção é distinto do uso de enzimas oxidantes de fenol como um agente detoxificante para auxiliar a decomposição de biomassa por outras enzimas. O benefício fornecido pela presente invenção é crescimento microbiano a- 20 perfeiçoado.

Depois de colocação em contato com a composição de enzima da invenção, a lignocelulose condicionada para crescimento microbiano pode ser usada diretamente em um processo microbiano ou submetida a manipulações adicionais. O tratamento com a composição de enzima da invenção 25 pode aliviar os problemas de viabilidade diminuída e/ou de lento crescimento de produção de micro-organismos e baixo rendimento, quando usa-se biomassa de lignocelulose como um componente de uma alimentação. Em comparação ao overliming, pouco ou nenhum resíduo é produzido quando do uso do método da invenção.

30 Contempla-se que a composição de enzima possa ser usada para condicionar lignocelulose pré-tratada, assim como lignocelulose pré-tratada. Conforme descrito em detalhe na Seção 6.1, uma ampla gama de

lignoceluloses não-tratadas pode ser usada na invenção. A composição de enzima da invenção pode ser usada vantajosamente para reduzir a extensão da etapa de pré-tratamento ou mesmo contornar a etapa de pré-tratamento. O termo biomassa de lignocelulose inclui materiais contendo lignocelulose tanto não tratada quanto previamente tratada. Lignocelulose previamente tratada também pode ser usada na invenção. Em particular, a invenção fornece o uso de enzima oxidante de fenol para condicionar biomassa de lignocelulose de não-madeira, tal como rejeitos de milho e bagaço de cana-de-açúcar, ou os hidrolisados correspondentes, tal que a biomassa condicionada seja mais adequada para sustentar o crescimento de micro-organismos. Em certos aspectos da invenção, é excluído o uso de lacase purificada e de peroxidase de lignina purificada isoladas de fungo de apodrecimento branco (*Trametes versicolor*) para tratar hidrolisado de madeira para fermentação etanólica.

O tratamento de biomassa de lignocelulose com a composição de enzima é realizado durante um período de tempo suficiente para diminuir a concentração de compostos fenólicos inibidores na biomassa de lignocelulose. O tratamento pode ser realizado separadamente a partir de etapas de processo subsequentes. Em uma concretização, o tratamento de biomassa de lignocelulose com a composição de enzima pode ser conduzido simultaneamente com o crescimento de micro-organismos de produção. Em outra concretização da invenção, o tratamento é realizado antes da introdução dos micro-organismos de produção. Em outras concretizações, o tratamento pode ser realizado depois que a lignocelulose tivesse sido tratada previamente. Biomassa de lignocelulose condicionada e composição compreendendo a mesma podem ser armazenadas para uso em um momento futuro. Consequentemente, a invenção fornece métodos para preparação de uma alimentação para cultivo de micro-organismos, nos quais uma biomassa de lignocelulose condicionada para crescimento microbiano com uma composição de enzima da invenção, é usada como um componente de uma alimentação.

Em uma concretização, a composição de enzima pode ser adicionada diretamente durante o cultivo da produção de micro-organismos. A

- composição de enzima pode ser adicionada em um momento durante o processo, por exemplo, no início do processo, em um estágio quando os compostos inibidores forem liberados, em um estágio quando os micro-organismos de produção forem adicionados à cultura, ou em um estágio 5 quando o crescimento dos micro-organismos de produção deva ser maximizado. Ainda em outra concretização, a composição de enzima pode ser produzida por uma ou mais cepas do micro-organismo de produção que façam a(s) enzima(s) de maneira natural ou de maneira recombinante e secretem a(s) enzima(s) para a cultura.
- 10 A composição de enzima compreende pelo menos uma enzima oxidante de fenol. Conforme descrito em detalhes na Seção 6.2, a enzima oxidante de fenol pode ser uma lacase produzida por um fungo, de preferência, um fungo filamentoso, e, muitíssimo preferivelmente, um fungo de Ascomiceto. A enzima oxidante de fenol pode estar em várias formas, tais como, mas não limitadas a, forma cristalina, forma immobilizada, filtrado de cultura fúngica e extratos de células fúngicas.
- 15 O uso de composição de enzima aperfeiçoa um ou mais aspectos do processo quando ele é comparado ao mesmo processo, exceto que o uso de lignocelulose que não tenha sido condicionada. Por exemplo, a cinética de crescimento microbiano em um biorreator ou o ganho em biomassa 20 microbiana sobre tempo unitário em um estágio particular de um processo podem ser aperfeiçoados. Em várias concretizações, os processos contemplados são usados para produzir um produto, tal como combustível, *commodities* químicas, produtos de química fina, enzimas, intermediários farmacêuticos, etc. Portanto, a invenção também engloba processos para a produção 25 de um produto desejado, que envolve o cultivo de micro-organismos que produzem o produto desejado em biomassa de lignocelulose condicionada, e a recuperação do produto desejado a partir do processo. Uma descrição detalhada dos tipos de processos, aos quais a invenção possa ser aplicada, é fornecida na Seção 6.3.

30 Para clareza de revelação, e não por meio de limitação, a descrição detalhada da invenção é dividida nas subseções que se seguem.

### 6.1 Biomassa de Lignocelulose

Uma variedade de biomassa vegetal pode ser usada na presente invenção. A biomassa vegetal mais abundante é lignocelulose em folhas e caules de plantas de madeira e de não-madeira. A lignocelulose é composta por cadeias de celulose intergeminadas heterogêneas com graus variáveis de cristalinidade, hemiceluloses e pectinas, encravadas em lignina. Tipicamente, o teor em celulose está na faixa de aproximadamente 35% a 50% de peso seco vegetal e de hemiceluloses e lignina, respectivamente, compreendem 20% a 35% e 5% a 30% de peso seco vegetal.

Conforme usado aqui, o termo "lignocelulose de madeira" refere-se à lignocelulose presente em plantas que compreendem madeira, que é o tecido de xilema secundário que forma o grosso do tronco e da raiz de uma planta de madeira. O xilema secundário é formado por um câmbio vascular e é encontrado em (i) coníferas (*Coniferae*) e (ii) angiospermas (*Angiospermae*) exceto plantas monocotiledôneas. Muitas coníferas são árvores altas e o xilema secundário de tais árvores é conhecido como madeira macia. Muitas angiospermas não-monocotiledôneas são árvores, e o xilema secundário destas é conhecido como madeira dura. O xilema secundário é também encontrado em membros dos grupos de gimnospermas *Gnetophyta* e *Ginkgophyta* e, em uma menor extensão, em membros das *Cycadophyta*.

Lignocelulose a partir da plantas de madeira incluem podas de jardins, chaparral, resíduos de moinhos (tais como cascas de árvores, lascas, raspados, serragem e os similares), resíduos de madeiras urbanos (tais como tábuas, páletes de madeira, caixotes, aparas de árvores e de feixes de lenha, etc), resíduos municipais (tais como jornais e produtos de mercearia descartados), resíduos de corte de lenha e desbastes de florestas (topos de árvores, troncos e ramagem fraca), culturas de madeira de rotação curta, tais como álamo e madeira de algodão, e resíduos industriais (tais como lodo de polpa de madeira, liquor de sulfito residual a partir de polpa).

O termo "lignocelulose de não-madeira" refere-se a biomassa vegetal derivada a partir de plantas monocotiledôneas, e, especialmente, espécies gramíneas pertencendo à família *Gramineae*. De interesse primário

são resíduos de agricultura gramíneos; isto é, a porção de plantas de portem grãos que permanecem depois da colheita das sementes. Biomassa de lignocelulose de não-madeira incluem, sem limitação, palha de trigo, palha de aveia, palha de arroz, palha de cevada, palha de centeio, palha de linho, bagaço de cana-de-açúcar, rejeitos de milho, caules de milho, espigas de milho, cascas de milho e os similares. Também incluídas dentro desta definição estão gramas não-convencionalmente cultivadas para finalidades agrícolas, tais como gramas dos prados (por exemplo, zaburro grande, zaburro pequena, grama indiana), "switchgrass", grama gama e rabo de raposa.

Outros subprodutos agrícolas que são considerados biomassa vegetal e que contêm lignocelulose, incluem componentes de correntes residuais a partir de processamento comercial de materiais de cultura (tais como polpa de beterraba açucareira, polpa de frutas cítricas, cascas de sementes e similares), resíduos animais celulósicos, cortes de gramados e algas.

Os materiais vegetais contendo lignocelulose podem ser modificados fisicamente, por exemplo, por retalhe, esmagamento, moagem, pulverização ou maceração. Os materiais vegetais contendo lignocelulose também podem estar embebidos em água, embebidos em água quente (isto é, acima da temperatura ambiente, por exemplo, em cerca de 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 95°C, 99°C, e em pressão normal ou acima da atmosférica), expostos a vapor ou a água superaquecida, ou submetidos a explosão com vapor. Em uma concretização, o material vegetal contendo lignocelulose não tinha sido previamente tratado quimicamente com ácido e/ou álcali.

Os termos "previamente tratado" ou "previamente tratado quimicamente" são usados intercambiavelmente para referir-se a uma etapa de processo, que converte lignocelulose a partir de sua forma nativa, na qual ela é, em geral, recalcitrante à ação de celulose, para uma forma para a qual a hidrólise enzimática é eficaz e/ou eficiente. O termo "hidrolisado" ou suas variações é aqui usado para referir-se a qualquer uma da lignocelulose anteriormente mencionada, que tenha sido previamente tratada para solubilizar pelo menos uma parte da xilana e da celulose no material e para liberar mo-

nômeros de açúcar. Exemplos não-limitantes de tratamento prévio incluem explosão com vapor na presença ou ausência de ácido sulfúrico diluído ou tratamento com cal extinta (isto é, óxido de cálcio extinto com água para formar hidróxido de cálcio).

5 O termo "lignocelulose", conforme usado aqui refere-se a qualquer um dos materiais vegetais contendo lignocelulose anteriormente mencionados que não tinham sido previamente tratados quimicamente. O termo "biomassa de lignocelulose" refere-se a qualquer um dos materiais vegetais contendo lignocelulose anteriormente mencionados em sua forma nativa, em  
10 uma forma fisicamente modificada (por exemplo, por retalhamento ou pulverização), em uma forma tratada com água ou com vapor, ou em uma forma depois de pré-tratamento químico, que os tornaria úteis como matéria-prima para o crescimento de micro-organismos. Biomassa de lignocelulose de madeira e biomassa de lignocelulose de não-madeira são derivados de plantas  
15 de madeira e de plantas de não-madeira, respectivamente. Tipicamente, biomassa de lignocelulose está presente em uma composição, tal como uma matéria-prima, como um de vários componentes de nutriente.

Dentre os subprodutos agrícolas disponíveis, os rejeitos de milho  
20 são a lignocelulose de não-madeira mais abundante nos Estados Unidos. Rejeitos de milho compreendem o caule, a espiga, a casca e as folhas deixadas de lado seguindo a colheita dos grãos. A coleta dos rejeitos pode ser facilmente realizada por desligamento do espalhador e/ou cortador no milho, combinação e catação dos resíduos por equipamento de embalagem de feno convencional. Aproximadamente 40% da matéria-seca em rejeitos de milho  
25 são celulose. O pré-tratamento com vapor remove a maior parte da hemicelulose a partir do material sólido e torna a celulose mais suscetível à digestão enzimática. Combinações diferentes de temperatura de reação, tempo e pH, durante o pré-tratamento com vapor podem ser aplicadas, por exemplo, 200°C, 5 minutos, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2%. O liquor seguindo a explosão com  
30 vapor pode ser usado para fermentação usando *Saccharomyces cerevisiae*. Em uma concretização, os rejeitos de milho são usados em uma forma bruta seca. Em outras concretizações, rejeitos de milho que tinham sido lavados

com ácido e/ou enxaguado com água também podem ser usados.

Outra lignocelulose de não-madeira abundante são os resíduos de cana-de-açúcar, por exemplo, bagaço, que é o resíduo fibroso depois que os caules de cana-de-açúcar são esmagados para extrair seus sucos. No 5 Brasil, o combustível de etanol é produzido a partir de cana-de-açúcar, que é a fonte mais eficaz de carboidratos fermentáveis do que o milho. O bagaço tem sido usado como combustível para fazer funcionar o processo de fermentação. Contempla-se que o bagaço de cana-de-açúcar e/ou seus hidrolisados também podem ser usados como uma fonte de nutrientes para o 10 crescimento de micro-organismos depois que ele tenha sido condicionado pelos métodos da invenção. Em uma concretização, o bagaço de cana-de-açúcar está em forma bruta seca que não tinha sido previamente tratado. Em outras concretizações, o bagaço de cana-de-açúcar é usado em uma forma que tenha sido lavada com ácido e/ou enxaguada com água.

15 Qualquer uma das biomassas de lignocelulose mencionadas acima pode ser usada diretamente em um processo microbiano, ou usada para preparar uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose, tal como uma matéria-prima. Em certas concretizações, prefere-se biomassa de lignocelulose, que não tenha sido previamente tratada quimicamente, 20 uma vez que o pré-tratamento com ácido ou álcali gera compostos inibidores do processo microbiano.

## 6.2 Composições de Enzima

A presente invenção fornece o uso de uma composição de enzima que compreende pelo menos uma enzima oxidante de fenol, para o 25 condicionamento de uma biomassa de lignocelulose ou de uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose. O termo "enzima oxidante de fenol", conforme usado aqui, refere-se a enzimas que funcionam por catálise de reações redox, isto é, a transferência de elétrons de um doador de elétrons (usualmente um composto fenólico) para oxigênio molecular (que atua 30 como um acceptor de elétrons), que é reduzido à água. Exemplos de tais enzimas são lacases (EC 1.10.3.2), bilirrubina oxidases (EC 1.3.3.5), fenol oxidases (EC 1.14.18.1), catecol oxidases (EC 1.10.3.1). As enzimas oxidantes

de fenol da presente invenção são capazes de usar uma ampla variedade de compostos fenólicos diferentes como doadores de elétrons, embora sejam muito específicos para oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio como um aceptor de elétrons.

5 Muitas enzimas oxidantes de fenol exibem valores ótimos de pH na faixa de pH ácida, enquanto são inativas em pHs neutros ou alcalinos. É preferível usar uma enzima oxidante de fenol, cujos valores ótimos de pH recaem dentro da faixa de pH da biomassa de lignocelulose. Sabe-se que enzimas oxidantes de fenol são produzidas por uma ampla variedade de 10 fungos, incluindo espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Neurospora*, *Podospora*, *Botrytis*, *Pleurotus*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Fomes*, *Phlebia*, *Trametes*, *Polyporus*, *Rhizoctonia* e *Lentinus*.

Em uma concretização, enzimas oxidantes de fenol produzidas por espécies de *Trichoderma* ou *Hypocrea* podem ser usadas nos métodos 15 da invenção. Espécies, cepas e isolados naturais de *Trichoderma*, e derivados de tais espécies, cepas e isolados, incluem cepas das espécies *Trichoderma piluliferum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*. *Trichoderma piluliferum* pode ser isolada a partir de amostras de solo, e foi descrita por J. Webster e Rifai, M. A. 1969, *Myco. Pap.* 116:16; ver também a patente 20 norte-americana de número 6.475.566 (também conhecida como *Hypocrea pilulifera*). Em uma concretização, enzimas oxidantes de fenol são produzidas por quaisquer fungos que cresçam em um substrato de madeira. Em uma concretização, quaisquer fungos de Ascomicetos, que produzam fenol oxidases, são usados.

25 A fonte de um gene de lacase para a presente invenção pode ser uma lacase de planta, de micrório, de inseto ou de mamífero. Em uma concretização, a(s) lacases(s) é(são) uma lacase fúngica. Por exemplo, a(s) lacase(s) podem ser uma lacase de fungo filamentoso, tal como uma lacase de uma espécie de *Acremonium*, *Agaricus*, *Amerosporium*, *Antrodiella*, *Armillaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Bjerkandera*, *Cerrena*, *Chae- 30 tomium*, *Chrysosporium*, *Cochliobolus*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Cryphonec-tria*, *Curvularia*, *Cyathus*, *Daedalea*, *Filibasidium*, *Fomes*, *Fusarium*, *Geotri-*

chum, *Giocladium*, *Gongronella*, *Halosarpheia*, *Humicola*, *Hypocrea*, *Lactarius*, *Lentinus*, *Magnaporthe*, *Monilia*, *Monocillium*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Panus*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phellinus*, *Phlebia*, *Pholiota Piromyces*, *Pleurotus*, *Podospora*, *Pycnoporus*, *Pyricularia*, *Rigidoporus*, *Rhizoctonia*, *Schizophyllum*, *Sclerotium*, *Scytalidium Sordaria*, *Sporotrichum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes (Polyporus)*, *Vereticilium*, *Zalerion*, *Zythia*, *Trichoderma*, ou uma lacase de levedura a partir de espécies de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* ou *Yarrowia*. Mais especificamente, a lacase pode ser uma lacase de *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Trametes villosa (Polyporus pinsitus)*, *Rhizoctonia solani* ou *Scytalidium thermophilum*.

Em outra concretização, a(s) lacase(s) são uma lacase de planta. Por exemplo, a(s) lacase(s) pode(m) ser uma lacase de laca, de manga, de feijão *mung*, pêssego, pinho, ameixa seca ou sicômoro. Ainda em outra concretização, a(s) lacase(s) são uma lacase de inseto. Por exemplo, a(s) lacase(s) podem ser uma lacase de *Bombyx*, *Calliphora*, *Diptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phorma*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca* ou *Tenebrio*.

Ainda em outra concretização, a(s) lacase(s) é(são) de preferência, uma lacase de bactéria. Por exemplo, a(s) lacase(s) pode(m) ser uma lacase de *Acer*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Clostridium*, *Gluconobacter*, *Halobacterium*, *Mycobacterium*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Wolinella*, ou de uma bactéria metilotrófica. Mais especificamente, a lacase é uma lacase de *Azospirillum lipoferum*.

Em outra concretização, as enzimas oxidantes de fenol produzidas por espécies de *Stachybotrys* podem ser usadas nos processos da invenção. Espécies, cepas e isolados naturais de *Stachybotrys*, e derivados de tais espécies, cepas e isolados, incluem cepas das espécies *Stachybotrys parvispora*, incluindo, em particular, *Stachybotrys parvispora var. hughes*

MUCL 38996; cepas das espécies *Stachybotrys chartarum*, incluindo, em particular, *Stachybotrys chartarum* MUCL 38898; *S. parvispora* MUCL 9485; *S. chartarum* MUCL 30782; *S. kampalensis* MUCL 39090; *S. theobromae* MUCL 39293; e cepas das espécies *S. bisbyi*, *S. cylindrospora*, *S. dichroa*,  
 5 *S. oenanthes* e *S. nilagerica*.

Lacases (benzenodiol:oxigênio oxidorredutases; E.C. 1.10.3.2) são enzimas contendo cobre que catalisam a oxidação de entes fenólicos. Oxidações mediadas por lacase produzem intermediários de radical arilóxi a partir de um substrato fenólico, que resultam na formação de produtos de  
 10 reação diméricos a poliméricos. Em uma concretização, a composição de enzima da invenção compreende uma lacase de uma espécie de *Stachybotrys*, conforme revelada na patente norte-americana de número 6.426.410 (ver, também, as patentes norte-americanas de números 6.168.936 e 6.905.853). Em outra concretização, a composição de enzima da invenção  
 15 compreende uma lacase de *Trichoderma piluliferum*.

A atividade de lacase pode ser determinada por quaisquer processos conhecidos na técnica, tais como oxidação com siringaldazina monitorada à 530 nm, oxidação com 10-(2-hidróxi-etyl)-fenoxazina (HEPO), que pode ser monitorada fotometricamente à 528 nm, ou oxidação de ácido 2,2'-azinobis-(3-etyl-benzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). Por exemplo, 60 µL de solução de estoque de siringaldazina (0,28 mM em etanol à 50%) e 20 µL de amostra de lacase são misturados com 0,8 mL de solução de tampão de Britton-Robinson previamente aquecida e incubados à 20°C. A oxidação é monitorada à 530 nm durante 5 minutos e a atividade é expressa como  
 20 "SOU" µmoles de siringaldazina oxidados por minuto ("SOU"). Ver, Childs et al. (1975, *Biochemical Journal* 145:93-103) e Bauer et al. (1971, *Analytical Chemistry* 43: 421-425).

Em uma concretização, a(s) enzima(s) oxidante(s) de fenol da invenção pode(m) ser prontamente produzida(s) por processo de síntese  
 30 bem conhecidos na técnica, se a sequência de aminoácidos da enzima for conhecida.

Em outra concretização, enzimas oxidantes de fenol da presente

invenção podem ser produzidas por cultivo de organismos produtores de enzima oxidante de fenol, incluindo fungos, bactérias e plantas. De preferência, durante o cultivo, o organismo produtor de enzima oxidante de fenol secreta a enzima oxidante de fenol extracelularmente. Isso permite a recuperação, isolamento e purificação da enzima oxidante de fenol, por exemplo, por separação da massa celular a partir de um caldo de cultura (por exemplo, por filtração ou centrifugação). O caldo de cultura livre de células resultante pode ser usado como tal ou, se desejado, pode, primeiro, ser concentrado (por exemplo, por evaporação ou ultrafiltração). Se desejado, a enzima oxidante de fenol pode ser, então, separada do caldo livre de células e isolada no grau de pureza desejado por processos convencionais, por exemplo, por cromatografia em coluna, ou mesmo cristalizada.

Em uma concretização específica, o organismo produtor de enzima oxidante de fenol é um organismo recombinante compreendendo materiais genéticos heterólogos que facilitem a expressão de um gene que codifica a enzima oxidante de fenol e/ou a produção da enzima oxidante de fenol. O material genético heterólogo compreende um polinucleotídeo que codifica uma sequência de aminoácidos que exibe atividades oxidantes de fenol. O termo "heterólogo", quando usado com referência a porções de um ácido nucléico, indica que o ácido nucléico compreende duas ou mais subsequências, que não formalmente encontradas no mesmo relacionamento umas com as outras na natureza.

"Funcionalmente equivalente", conforme o termo é usado aqui, refere-se a um polipeptídeo capaz de exibir uma atividade oxidante de fenol substancialmente similar ou pelo menos uma característica química que a lacase a partir de *Trichoderma piluliferum*, conforme exemplificado na Seção 7, ou a lacase a partir de espécies de *Stachybotrys*, conforme descrito na patente norte-americana de número 6.426.410 (ver, por exemplo, as patentes norte-americanas de números 6.168.936 e 6.905.853). Conforme usado aqui, o termo "característica química" refere-se ao substrato ou à funcionalidade química, sobre os quais a enzima atua e/ou a reação catalítica realizada pela enzima.

Em adição ao ADN de lacase exemplificado e proteínas ensinadas aqui, a presente invenção contempla a utilização de enzimas oxidantes de fenol homólogas ou substancialmente idênticas. O termo "idênticas", no contexto de duas sequências de polipeptídeos ou de ácidos nucleicos, refere-se aos resíduos nas duas sequências que sejam as mesmas quando alinhadas para correspondência máxima, conforme medido usando um dos seguintes "algoritmos de comparação de sequências". O alinhamento de sequências ótimo para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), pelo método de busca por similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no *Wisconsin Genetics Software Package*, *Genetics Computer Group*, 575 Science Dr., Madison, Wis.), ou por inspeção visual. Outra indicação de que duas enzimas oxidantes de fenol são substancialmente similares é que a primeira enzima seja imunologicamente reativa de maneira cruzada com a segunda enzima. Tipicamente, enzimas que difiram por substituições de aminoácidos conservativas são imunologicamente reativas de maneira cruzada. Portanto, uma enzima oxidante de fenol é substancialmente similar a uma segunda enzima oxidante de fenol, por exemplo, quando as duas enzimas diferirem somente por uma substituição conservativa.

Em adição, os processos da invenção também englobam proteínas e polipeptídeos que são funcionalmente equivalentes de enzimas oxidantes de fenol de ocorrência natural. Tais enzimas oxidantes de fenol equivalentes podem conter, por exemplo, eliminações, adições ou substituições de resíduos de aminoácidos dentro das sequências de aminoácidos de enzimas oxidantes de fenol. As substituições de aminoácidos podem ser feitas com base em similaridade em polaridade, carga, solubilidade, hidroficiade, hidrofilicidade e/ou na natureza anfipática dos resíduos envolvidos. Por exemplo, resíduos de aminoácidos não-polares (isto é, hidrofóbicos) podem incluir alanina (Ala ou A), leucina (Leu ou L), isoleucina (Ile ou I), valina (Val

ou V), prolina (Pro ou P), fenilalanina (Phe ou F), triptofano (Trp ou W) e metionina (Met ou M); resíduos de aminoácidos neutros polares podem incluir glicina (Gly ou G), serina (Ser ou S), treonina (Thr ou T), cisteína (Cys ou C), tirosina (Tyr ou Y), asparagina (Asn ou N) e glutamina (Gln ou Q); resíduos de aminoácidos carregados positivamente (isto é, básicos) podem incluir arginina (Arg ou R), lisina (Lys ou K) e histidina (His ou H); e resíduos de aminoácidos carregados negativamente (isto é, ácidos) podem incluir ácido aspártico (Asp ou D) e ácido glutâmico (Glu ou E).

Será evidente aos técnicos especializados no assunto que tais substituições podem ser feitas fora das regiões críticas para a função da molécula e ainda resultem em um polipeptídeo ativo. Resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade do polipeptídeo codificado pela sequência de ácidos nucleicos isolada da invenção, e, portanto, de preferência, não-sujeitos à substituição, podem ser identificados de acordo com procedimento conhecidos na técnica, tais como mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese de varredura de alanina (ver, por exemplo, Cunningham e Wells, 1989, *Science* 244:1081-1085).

Polipeptídeos funcionalmente equivalentes correspondendo a um ou mais domínios dos produtos de genes de enzimas (por exemplo, sequências de sinal, sítios ativos ou domínios de ligação a substratos), enzimas truncadas ou eliminadas (por exemplo, polipeptídeos, nos quais um ou mais domínios de uma enzima são eliminados) e enzimas de fusão (por exemplo, proteínas, nas quais um comprimento completo ou enzima truncada ou eliminada, ou um peptídeo ou polipeptídeo correspondendo a um ou mais domínios de uma enzima está fundido a uma proteína não-relacionada) estão também dentro do escopo da presente invenção. Tais peptídeos e polipeptídeos funcionalmente equivalentes (aos quais também refere-se como proteínas ou polipeptídeos quiméricos) podem ser prontamente projetados pelos técnicos especializados no assunto com base nas sequências de aminoácidos de nucleotídeos de gene de enzima. Exemplos de proteínas de fusão podem incluir, mas, não estão limitados a, proteínas de fusão com etiqueta de epítopo, que facilitam o isolamento do produto de gene de enzima

por cromatografia por afinidade usando reagentes que se ligam ao epítopo. Outros exemplos de proteínas de fusão incluem fusões a qualquer sequência de aminoácidos, que permitem, por exemplo, que a proteína de fusão sejam imobilizadas por sobre uma fase sólida, por meio do quê se permite

5 que a enzima seja retida e reutilizada depois de uma reação. Consequentemente, a invenção fornece uma proteína de fusão compreendendo um fragmento de uma enzima oxidante de fenol fundido a um segundo polipeptídeo. Outras modificações da enzima oxidante de fenol descritas podem ser feitas

10 para gerar polipeptídeos funcionalmente equivalentes que sejam melhor adequados, por exemplo, para aumento de escala, para o ambiente de pH de uma biomassa de lignocelulose particular, etc. Consequentemente, a presente invenção engloba o uso de polipeptídeos que são funcionalmente equivalentes a enzimas oxidantes de fenol.

A invenção engloba composições de enzima compreendendo

15 uma quantidade cataliticamente eficaz de pelo menos uma enzima oxidante de fenol, isolada, purificada ou enriquecida a vários graus, por exemplo, uma enzima oxidante de fenol pode constituir cerca de 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% da proteína total na composição. Procedimentos para determinação de atividade de lacase, por exemplo, são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, a oxidação do substrato de ácido 2,2'-azinobis-(3-etyl-benzotiazolina-6-sulfônico ("ABTS") (ver, Childs et al., 1975, *Biochemical Journal* 145:93-103) ou siringaldazina (ver, Bauer et al., 1971, *Analytical Chemistry* 43: 421-425), ou o uso de 2,6 dimetóxi-fenol (ver Haars et al. , 1981, *European Journal of Forest Pathology*, 11(1-2), 67-76) ou guaiacol (ver Setti et al., 1999, *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3-5), 285-289).

A(s) enzima(s) na composição estão em uma forma adequada para uso com a biomassa de lignocelulose pretendida, e pode(m) conter enzimas adicionais, agentes estabilizantes, preservantes, inibidores de protease, detergentes, agentes antiespumantes, etc. Frequentemente, esses processos são eficazes quanto aos custos somente quando as enzimas possam ser reutilizadas muitas vezes. Para reutilização das enzimas, as enzimas

necessitam ser separadas da massa do processo. Isso pode ser conseguido quando as enzimas estiverem ligadas a um veículo ou fase sólida, que possa ser isolada, por exemplo, por drenagem, filtração ou centrifugação. Isso pode ser conseguido se o substrato for escoado através da superfície da

5 fase sólida quando contatos com as enzimas são feitos. Consequentemente, a presente invenção engloba o uso de enzimas oxidantes de fenol, que existem não somente em forma solúvel de escoamento livre, mas, também, em formas imobilizada ou sólida.

Em outra concretização, as enzimas oxidantes de fenol da invenção estão imobilizadas na forma de proteínas purificadas em graus variáveis, conforme descrito acima. Qualquer processo conhecido para a imobilização de enzima, baseado em ligação química e física da enzima a uma fase sólida, por exemplo, polissacarídeos, vidro, polímeros sintéticos, partículas magnéticas, que usualmente estão modificadas com grupos funcionais, tais como amina, carbóxi, epóxi, fenila ou alcano, para permitir acoplamento covalente a cadeias laterais de aminoácidos na superfície da enzima, pode ser usados. A fase sólida pode ser porosa, com diâmetros de poros na faixa de 30 a 300 nm. Adsorção iônica e não-iônica a suporte poroso pode ser um processo de imobilização simples e eficaz. As enzimas também podem ser aprisionadas ou encapsuladas em géis poliméricos, membranas ou micelas em gotículas aquosas estabilizadas com tensoativo. A escolha de um método de imobilização adequado para uma dada enzima depende das características de enzima, exigências de processo, propriedades do suporte e questões de segurança, e podem ser determinadas por um técnico especializado no assunto. Processos de imobilização de enzimas podem ser encontrados, por exemplo, em *Methods of Enzymology*, vol. 44, 135, 136 e 137, Academic Press, New York. Consequentemente, a invenção engloba o uso de uma composição de enzima, que compreende uma ou mais fases sólidas, em que enzima(s) oxidante(s) de fenol cataliticamente ativa(s) esteja(m) presente(s) na(s) fase(s) sólida(s).

A invenção engloba adicionalmente usando enzimas oxidantes de fenol em forma sólida. Processos para preparar formas sólidas de enzi-

mas são bem conhecidos na técnica, tais como, mas, não limitados a, "prilling" (resfriamento por atomização em um material ceroso), extrusão, aglomeração ou granulação (diluição com um material inerte e aglutinantes). Composições de enzima sólidas compreendendo uma forma sólida de uma 5 enzima oxidante de fenol, na forma de pó misto, tabletes e os similares são contempladas.

### 6.3 Micro-Organismos de Produção

De acordo com a invenção, biomassa de lignocelulose ou uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose condicionada por 10 enzimas oxidantes de fenol podem ser usadas como uma fonte de nutrientes para uma variedade de processos biotecnológicos. O condicionamento da biomassa de lignocelulose aperfeiçoa a velocidade de crescimento de micro-organismos de produção, acelerando a conversão de biomassa vegetal em biomassa microbiana. Além de acumulação de biomassa microbiana, em 15 outras concretizações, o objetivo do crescimento dos micro-organismos em biomassa de lignocelulose é obter um ou mais produtos feitos pelos micro-organismos. Como um resultado do uso da composição de enzima da invenção, em certas concretizações, não somente a cinética do processo é aperfeiçoada, mas, o rendimento do(s) produto(s) desejado(s) é também aumentado. 20 O termo "micro-organismo de produção", conforme usado aqui refere-se a uma espécie de um micro-organismo, que produz um produto desejado em um processo microbiano, ou seja o próprio produto desejado de um processo microbiano. O termo também engloba qualquer progenia dos micro-organismos crescendo no processo.

25 Muitos processos microbianos que utilizam biomassa de lignocelulose como uma fonte de nutriente podem ser beneficiados pelos processos da invenção, incluindo, mas, não limitados a processos microbianos para preparar enzimas industrialmente úteis, tais como, mas, não limitadas a uma hidrolase, uma oxidorredutase, uma isomerase, uma ligase, uma liase ou 30 uma transferase. Mais preferivelmente, a enzima é celulases (endoglcanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases), tanases, oxidases, por exemplo, glicose oxidases, glicoamilases, fitases,  $\beta$ -galactosidases, sacarases ou inver-

tases, lipases, proteases, amilases, lacases, poligalacturonases, carbóxi peptidases, catalases, quitinases, cutinases, ciclodextrina glicosil transferases, deoxirribonucleases, esterases, haloperoxidases, lacases, manosidas, enzimas pectinolíticas, peroxidases, xilose isomerases e xilanases. Outros produtos úteis, que são produzidos por culturas microbianas, incluem ácidos orgânicos, tais como, mas, não limitados a ácido cítrico, ácido itacônico, ácido glicônico, ácido fumárico, ácido málico, ácido lático e ácido tartárico; aminoácido, tais como, mas, não limitados a, triptofano, lisina, metionina, ácido glutâmico, treonina, alanina, fenil-alanina e ácido aspártico; polissacarídeos, tal como, mas, não limitados a, pululana; lipídeos, nucleotídeos e vitaminas. Outros produtos úteis, que são produzidos por culturas microbianas, incluem alcoóis, tal como, mas, não limitado a, etanol. Outros produtos úteis, que são produzidos por culturas microbianas, incluem glicose, que pode ser usada subsequentemente por outro micro-organismo para fazer etanol, ou usada como um substrato de fermentação para fazer qualquer tipo de produto de base microbiana.

Micro-organismos de produção incluem, mas, não estão limitados a, bactérias e fungos, incluindo leveduras. Muitos Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos são conhecidos por suas enzimas celulolíticas e/ou capacidade de degradar madeira e podem usar biomassa de lignocelulose como uma fonte de nutriente. Tais fungos incluem, mas, não estão limitados a, espécies dentro dos gêneros *Bulgaria*, *Chaetomium* e *Helotium* (Ascomicetos); *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum* e *Serpula* (Basidiomicetos) e *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Deuteromicetos). Exemplos de espécies que podem usar biomassa de lignocelulose como uma fonte de nutriente, incluem, mas, não estão limitados a, espécies de *Trichoderma* ou *Hypocrea*. Em uma concretização, a espécie de *Trichoderma* é *Trichoderma reesei*.

Vários grupos diversos de bactérias podem crescer em biomassa de lignocelulose: (i) anaeróbicos fermentativos, tipicamente gram-positivas (*Clostridium*, *Ruminococcus* e *Caldicellulosiruptor*), mas, contendo

umas poucas espécies gram-negativas, (*Butyrivibrio* e *Acetivibrio*, *Fibrobacter*); (ii) bactérias aeróbicas gram-positivas (*Cellulomonas* e *Thermobifida*); e (iii) bactérias aeróbicas esféricas (*Cytophaga* e *Sporocytophaga*). Exemplos de bactérias, que podem usar lignocelulose como um nutriente, incluem, 5 mas, não estão limitadas a *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulovorans* e *Clostridium josui*.

O desenvolvimento de micro-organismos para a conversão de celulose é perseguido de acordo com duas estratégias. A estratégia celulolítica nativa envolve micro-organismos celulolíticos de ocorrência natural, para 10 aperfeiçoar as propriedades relacionadas a produto, tais como rendimento e tolerância. Tais micro-organismos podem ser micro-organismos de produção da invenção e incluem, mas, não estão limitado a, *Clostridium thermocellum*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma viride*, espécies de *Zygosaccharomyces*, espécies de *Aspergillus* e espécies de *Paecilomyces*. A abordagem celulolítica 15 recombinante envolve a engenharia de micro-organismos não celulolíticos, que exibem elevados rendimentos em produto e tolerância, de modo que eles tornem-se capazes de utilizar celulose como um resultado de um sistema de celulase heterólogo. Tais micro-organismos também podem ser micro-organismos de produção da invenção e incluem, mas, não estão limitados a 20 *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* e *Zymomonas mobilis*.

Consequentemente, os métodos da invenção podem ser usados para aperfeiçoar a cinética de crescimento e/ou o rendimento em cultura de micro-organismos que naturalmente expressem celulases ou que sejam submetidos à engenharia genética para expressarem celulase(s) heterólogo(s), e que permita(m) seu uso de celulose como fonte de nutriente. 25

#### 6.4 Processos da Invenção

A presente invenção fornece um método para tratamento de uma biomassa de lignocelulose ou de uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose (tal como uma matéria-prima compreendendo outros nutrientes) com uma composição de enzima compreendendo uma enzima oxidante de fenol, tal que a velocidade de crescimento de um micro-organismo de produção, na biomassa de lignocelulose ou na composição é 30

aumentada, em relação a biomassa de lignocelulose ou composição compreendendo biomassa de lignocelulose que não tenha sido tratada com a composição de enzima. O aumento de velocidade de crescimento de um micro-organismo de produção em um processo em um processo pode ser estimado por inúmeros parâmetros, tais como, mas, não limitados a, consumo de nutrientes, acumulação de catabólitos, pH, massa de células, número de células, etc. Em várias concretizações da invenção, o tratamento com a composição de enzima aumenta a velocidade de crescimento inicial dos micro-organismos em uma cultura, na qual uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose seja usada como uma fonte de nutriente.

Em uma concretização, a invenção fornece um método para condicionamento de biomassa de lignocelulose ou de uma composição compreendendo uma enzima oxidante de fenol com a biomassa de lignocelulose ou a composição compreendendo biomassa de lignocelulose. O termo "colocação em contato" é usado aqui de maneira intercambiável como o seguinte: introdução em, combinado com, adicionado a, misturado com, passado sobre, incubado com, injetado em, escoado sobre, etc. Contempla-se que podem ser usadas diferentes formas da enzima oxidante de fenol, conforme aqui descrita. O processo de condicionamento ou de tratamento pode ocorrer durante um período de tempo, variando desde 1 hora, 2, 5, 10, 15, 20 24, 36, 48, 60, 72 horas a 4, 5, 6, 7 dias, ou até que a atividade inibidora da biomassa de lignocelulose seja reduzida a um nível aceitável, por exemplo, menos do que 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 90%, 95% do nível original. O período de tempo para contato também pode ser determinado por medição do aumento de velocidade de crescimento de um micro-organismo que seja suportado pela composição condicionada, por exemplo, pelo menos 110%, 120%, 125%, 130%, 140%, 150%, 175%, 200%, 300, 400%, 500% ou 1.000% da velocidade original.

De preferência, a etapa de colocação em contato é realizada sob uma temperatura dentro de uma faixa na qual a enzima exiba atividade substancial ou ótima. De preferência, a etapa de colocação em contato é realizada em uma faixa de pH, na qual a enzima exiba atividade substancial

ou ótima. Consequentemente, a invenção engloba uma composição compreendendo uma biomassa de lignocelulose, que tenha sido tratada ou condicionada para suportar crescimento microbiano com uma composição de enzima compreendendo uma enzima oxidante de fenol. Uma tal composição 5 pode ser usada como uma matéria-prima ou usada como um componente para preparar uma matéria-prima. A biomassa de lignocelulose condicionada pode ser usada como uma matéria-prima para uma variedade de processos microbianos. Em certas concretizações, a biomassa de lignocelulose é a única fonte de nutriente ou única fonte de carbono na composição. Em uma 10 concretização, a invenção fornece um método para preparação de uma matéria-prima compreendendo a colocação em contato de uma composição de enzima compreendendo uma enzima oxidante de fenol com a biomassa de lignocelulose ou a composição compreendendo biomassa de lignocelulose, e a adição de outros nutrientes e/ou componentes de matéria-prima à biomassa 15 de lignocelulose condicionada. Em algumas concretizações, a composição de enzima é removida da composição compreendendo a biomassa de lignocelulose antes do uso da composição em um processo microbiano. Em várias concretizações, uma faixa de concentrações de enzima pode ser usada para condicionar a matéria-prima, por exemplo, desde cerca de 0,0001 20 g/L a cerca de 100 g/L, tal como, mas, não limitado a 0,001 g/L, 0,1 g/L, 1 g/L, 10 g/l. Em várias concretizações, uma faixa de duração do tratamento ou do condicionamento pode ser usada, por exemplo, cerca de 15 segundos a cerca de 200 horas, tal como, mas, não limitado a 1 minuto, 5 minutos, 15 25 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas, 10 horas, 24 horas, 36 horas, 72 horas ou 96 horas. Em várias concretizações, o tratamento ou o condicionamento pode ser realizado em uma faixa de temperaturas, por exemplo, em cerca de 15°C a cerca de 100°C, tal como, mas, não limitado a, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, ou temperatura ambiente no local do tratamento ou do condicionamento. Em várias 30 concretizações, o tratamento ou o condicionamento pode ser realizado em uma faixa de pH, por exemplo, em cerca de pH 2 a cerca de pH 10, tal como, mas, não limitado a cerca de pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 ou pH 9.

Em uma concretização, os métodos são realizados na faixa de pH 4,5 a 6,5. Em outra concretização, o pH é de cerca de 4,5 a 5,5.

A invenção fornece adicionalmente métodos para o cultivo de micro-organismos de produção em um meio de cultura compreendendo biomassa de lignocelulose, sendo que os métodos compreendem a colocação em contato do meio de cultura com uma composição de enzima compreendendo uma enzima oxidante de fenol. Em outra concretização, a invenção fornece o uso de biomassa de lignocelulose condicionada para micro-organismos de crescimento. A invenção fornece adicionalmente métodos para a produção de um produto, em que o produto é preparado por um micro-organismo de produção que é cultivado em um meio de cultura compreendendo biomassa de lignocelulose condicionada. Tais métodos compreendem o crescimento dos micro-organismos de produção em um meio de cultura tratado com uma composição de enzima compreendendo uma enzima oxidante de fenol e a recuperação do produto a partir da cultura e/ou dos micro-organismos.

Contempla-se que processos microbianos para produção de um produto desejado incluem cultura sólida ou submersa, incluindo processos em batelada, em batelada alimentada e de escoamento contínuo. O cultivo é realizado em um meio, que compreende um meio com sais minerais aquoso, fatores de crescimento orgânicos, materiais de fonte de carbono, materiais de fonte de energia ou uma combinação desses, e um inóculo de partida de uma ou mais espécies de micro-organismos de produção a serem empregadas.

Contempla-se que a invenção possa ser aplicada a muitos tipos diferentes de processos, assim como a diferentes estágios de um processo complexo. Um exemplo de um processo complexo é a conversão de lignocelulose em açúcares e, então, em etanol, que pode envolver diferentes micro-organismos em estágios distintos do processo.

No contexto da conversão de lignocelulose em combustíveis e entes químicos, os seguintes processos estão envolvidos: (i) produção de celulase, (ii) hidrólise de celulose e, se presentes, outros polissacarídeos

insolúveis (sacarificação), (iii) fermentação de produtos de hidrólise de celulose solúveis e (iv) fermentação de produtos de hidrólise de hemicelulose solúveis. À extensão em que esses processos sejam realizados por cultivo de micro-organismos na presença de biomassa de lignocelulose, a composição 5 de enzima ou a biomassa de lignocelulose condicionada da invenção podem ser utilizadas em uma ou mais dessas etapas individuais para aperfeiçoar a cinética de crescimento dos micro-organismos e/ou o rendimento de cada etapa.

Essas quatro etapas podem ser realizadas separadamente ou 10 consolidadas em várias configurações. Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) consolidam a hidrólise e a fermentação de produtos de hidrólise de celulose em uma etapa de processo, com a produção de celulase e a fermentação de produtos de hidrólise de hemicelulose que ocorrem em duas etapas de processo discretas adicionais. A sacarificação e a cofermentação 15 simultâneas (SSCF) envolvem duas etapas de processo: produção de celulase e uma segunda etapa, na qual ocorrem a hidrólise de celulose e a fermentação de produtos de hidrólise tanto de celulose quanto de hemicelulose. No bioprocessamento consolidado (CBP), a produção de celulase, hidrólise e fermentação de produtos de celulose e de hemicelulose são combinadas. De acordo com a invenção, a composição de enzima também pode ser 20 usada em uma ou mais etapas nesses processos consolidados, para aperfeiçoar a cinética de crescimento dos micro-organismos e/ou o rendimento de cada etapa. Alternativamente, biomassa de lignocelulose condicionada (previamente tratada com a composição de enzima da invenção) pode ser 25 usada em uma ou mais etapas nesses processos consolidados.

Consequentemente, em uma concretização da invenção, uma composição de enzima, compreendendo uma ou mais enzimas oxidantes de fenol, pode ser usada em um processo de preparação de celulases. A composição de enzima pode ser adicionada à cultura de produção de micro-organismos, que fazem celulase, a qual compreende biomassa de lignocelulose 30 como uma fonte de nutriente. O método também engloba a recuperação das celulase a partir da cultura.

Em outra concretização, uma composição de enzima, compreendendo uma ou mais enzimas oxidantes de fenol, pode ser usada em um processo de cultivo de micro-organismos em um meio de cultura compreendendo biomassa de lignocelulose, sendo que o micro-organismo hidrolisa celulose e outros polissacarídeos insolúveis, para formar dissacarídeos e monossacarídeos. O processo, opcionalmente, pode incluir a recuperação dos dissacarídeos e monossacarídeos.

Ainda em outra concretização, uma composição de enzima, compreendendo uma ou mais enzimas oxidantes de fenol, pode ser usada em um processo de cultivo de micro-organismos em um meio de cultura compreendendo biomassa de lignocelulose, sendo que os micro-organismos são capazes de converter açúcares (tais como dissacarídeos e monossacarídeos) em etanol ou em outros entes químicos de baixo peso molecular, tais como ácido acético ou ácido lático. Ainda em outra concretização, uma composição de enzima, compreendendo uma ou mais enzimas oxidantes de fenol, pode ser usada em um processo de cultivo de micro-organismos, que sejam capazes de converter hemicelulose em etanol ou em outros entes químicos de baixo peso molecular, tais como ácido acético ou ácido lático.

Em cada uma das concretizações acima, ao invés de se usar a composição de enzima diretamente no processo, ela pode ser usada para tratar uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose, que é, então, usada para cultivo dos micro-organismos de produção.

Em várias concretizações, a biomassa de lignocelulose usada em qualquer dos processos mencionados acima é lignocelulose derivada a partir de uma planta de madeira, lignocelulose derivada de uma planta de não-madeira, um hidrolisado de uma lignocelulose ou uma mistura de uma lignocelulose e seu hidrolisado.

Em certas concretizações da invenção, a biomassa de lignocelulose usada em um processo de fermentação, para fazer etanol, é biomassa de lignocelulose de não-madeira, tais como hidrolisados de madeira. Em outras concretizações da invenção, a biomassa de lignocelulose usada no processo são hidrolisados de não-hemicelulose. Em certas concretizações,

os micro-organismos de produção, que podem crescer em biomassa de lignocelulose de madeira e fazer etanol não são cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Em certas concretizações, a composição de enzima usada no processo não compreende uma lacase derivada de um Basidiomiceto, tal como 5 uma lacase de *Trametes versicolor*.

Em uma concretização da invenção, a composição de enzima é usada em um processo de sacarificação e de fermentação simultâneas. Ainda em outra concretização, a composição de enzima é usada em um processo de sacarificação e de cofermentação simultâneas. Ainda em outra 10 concretização, a composição de enzima é usada em bioprocessamento consolidado. Em uma concretização, a concentração de enzima usada para tratamento de biomassa de lignocelulose varia desde cerca de 0,001 g/L a 100 g/L. Em uma concretização relacionada, a concentração da enzima usada para tratamento de biomassa de lignocelulose não é menor do que cerca de 15 60 g/L, cerca de 30 g/L, cerca de 1 g/L, cerca de 0,6 g/L, cerca de 0,3 g/L, cerca de 0,01 g/L, cerca de 0,006 g/L, ou cerca de 0,003 g/L.

## 7. Exemplos

A presente invenção pode ser melhor entendida por referência ao seguinte exemplo não limitante, que é fornecido somente como exemplificativo da invenção. Os exemplos seguintes são apresentados para ilustrar mais completamente uma concretização da invenção. Entretanto, os exemplos não devem, de maneira alguma, ser construídos como limitantes do escopo mais amplo da invenção. 20

O experimento foi conduzido com lacase de *Trichoderma piluliferum*, rejeitos de milho brutos como a biomassa de lignocelulose e *Trichoderma reesei* como o micro-organismo de produção. 25

### 7.1 Materiais e Métodos

#### Produção de Enzima de *Trichoderma reesei*

Um inóculo de *Trichoderma reesei* RL-P37 (ver Sheir-Neiss et al. 30 em *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 20 (1984) págs. 46-53) foi preparado como se segue: um frasco de agitação contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (4 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (4,5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1 g),  $\text{NaCl}$  (0,01 g), Mazu DF 204 5 go-

tas/L (0,2 mL), pH 5,5, q.s.p. para 897,5 mL. Depois de esterilização, 100 mL de glicose à 50% e 2,5 mL de solução de elementos trações para *T. reesei* foram adicionados. A solução de elementos trações para *T. reesei* continha, por litro: ácido cítrico (anidro) 175 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (200 g), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (16 g), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (3,2 g), MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1,4 g), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (ácido bórico) (0,8 g). A glicose era a única fonte de carbono em uma concentração de 10 g/L. A cultura foi inoculada com cerca de um milhão de esporos de RLP-37 por 50 mL, em um frasco de 250 mL. O frasco foi incubado à 26-28°C, 150 rpm, durante 3-5 dias, até que fosse obtido bom crescimento. O crescimento da cultura pode ser seguido por medição do pH e da concentração de glicose ao longo do tempo por técnicas-padrão. Antes da exaustão da glicose, células fúngicas podem ser tiradas para inocular frascos para o experimento.

Nesse experimento, dois conjuntos de frascos foram dispostos, cada frasco contendo os mesmos meios conforme acima e rejeitos de milho brutos à 2%. Os materiais de milho contendo lignocelulose tinham sido retalhados, lavados com água para remover solo e outros detritos de fazenda, e secados ao ar. A aparência era aquela de aparas de grama seca. Ele foi adicionado aos frascos de cultura nessa forma seca e os frascos foram autoclavados para esterilizar os conteúdos antes que a cultura fosse introduzida. A um conjunto de frascos, foi adicionada uma alíquota de um filtrado contendo lacase a partir de uma cultura de *Trichoderma piluliferum*. Três diferentes concentrações de lacase foram usadas, denominadas: 0,125 U/mL, 0,25 U/mL e 0,5 U/mL.

A presença de atividade de enzima oxidante de fenol no sobre-nadante foi medida usando o seguinte procedimento de ensaio, baseado na oxidação de ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etyl-benzotiazolina-6-sulfonato)) por oxigênio. ABTS (SIGMA, 0,2 mL, 4,5 mM H<sub>2</sub>O) e NaOAc (1,5 mL, 120 mM em H<sub>2</sub>O, pH 5,0) foram misturados em uma cubeta. A reação foi iniciada por adição de uma quantidade apropriada da preparação a ser medida (que, neste exemplo, é a diluição de sobre-nadante) para formar uma solução final de 1,8 mL. A cor produzida pela oxidação de ABTS foi, então, medida a cada 2 segundos, durante um período total de 14 segundos, por registro da densi-

dade óptica (DO) à 420 nm, usando um espectrofotômetro. Uma unidade de ABTS (uma unidade de enzima ou EACU) neste exemplo é definida como a mudança em DO medida à 420 nm por minuto (dada nenhuma diluição da amostra).

5                   O conjunto de frascos de controle carecia de lacase. Os frascos foram incubados durante um, dois ou três dias à 30°C, antes de serem inoculados com cerca de um milhão de células RLP-37, que tinham sido cultivadas durante 24 horas, conforme descrito acima. Os dois conjuntos de frascos contendo as células RLP-37 foram cultivados sob agitação à 100-  
10 250 rpm, à 20-28°C, durante até 72 horas. O crescimento de *T. reesei* nos dois conjuntos de frascos foi monitorado por medição da concentração de glicose nos meios de cultura, que goteja gradualmente conforme os fungos em crescimento consumam glicose.

### 7.2 Resultados

15                   Os resultados do experimento são mostrados na Figura 1. A concentração decrescente de glicose indica bom crescimento das células fúngicas. As melhores velocidades de crescimento foram obtidas em frascos contendo um meio de cultura compreendendo uma biomassa de lignocelulose (rejeitos de milho à 2%) que tinha sido condicionada por 0,5 U/mL de lacase durante pelo menos dois dias. Em dois frascos (2 e 3 dias de condicionamento com 0,5 U/mL), toda a glicose nos frascos foi exaurida no terceiro dia de cultivo de *T. reesei*. Doses de lacase mais baixas ou períodos de condicionamento mais curtos produziram culturas com crescimento menos rápido. Menos do que 50% da glicose foi consumida pelos fungos em frascos que foram tratados com 0,25 U/mL de lacase, independentemente do período de condicionamento. O frasco de controle, que não tinha sido tratado com lacase, exibiu o crescimento mais lento.

### 8. Equivalentes

30                   A presente invenção não deve ser limitada, em escopo, por concretizações específicas descritas, as quais são pretendidas como simples ilustrações de aspectos individuais da invenção, e processo e componentes funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo da invenção. De fato,

várias modificações da invenção, em adição àquelas mostradas e descritas aqui, tornar-se-ão evidentes aos técnicos especializados no assunto a partir da prescrição precedente e desenhos acompanhantes, usando não mais do que experimentação de rotina. Pretende-se que tais modificações e equiva-

- 5 lentes recaiam dentro do escopo das reivindicações apensas.

Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados por referência ao relatório descritivo na mesma extensão como se cada publicação, patente ou pedido de patente individuais fossem especificamente e individualmente indicados para serem aqui incorporados por referência.

10 Citação ou discussão de uma referência aqui não devem ser construídas como uma admissão de que tal é técnica anterior à presente invenção.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para cultivar um micro-organismo de produção que produz uma proteína desejada, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende

5 a colocação de uma composição compreendendo uma biomassa de lignocelulose em contato com uma enzima oxidante de fenol, durante um período de tempo suficiente para condicionar a composição para crescimento microbiano, e

10 o crescimento dos micro-organismos na dita composição condicionada,

sendo que a velocidade de crescimento do micro-organismo cultivados na composição condicionada é aumentada em relação àquela de uma composição compreendendo biomassa de lignocelulose que não foi colocada em contato com a enzima,

15 sendo que a dita biomassa de lignocelulose compreende biomassa de lignocelulose que não foi submetida a tratamento ácido prévio, e

sendo que o dito micro-organismo é uma espécie de *Trichoderma*.

20 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a biomassa de lignocelulose compreende hidrolisados de biomassa de lignocelulose.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a biomassa de lignocelulose compreende biomassa de lignocelulose diferente de madeira.

25 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a biomassa de lignocelulose diferente de madeira é rejeito de milho ou bagaço de cana-de-açúcar.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a enzima oxidante de fenol é uma lacase.

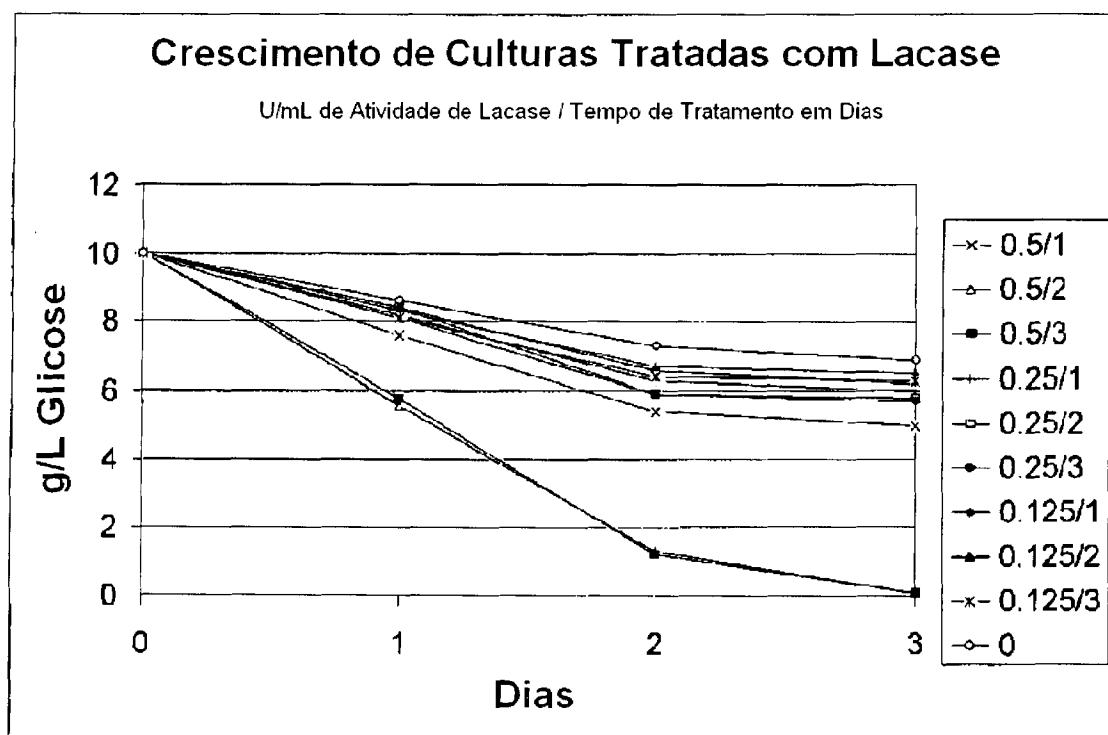
30 6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita lacase é uma lacase de espécies de *Stachybotrys* ou lacase de espécies de *Trichoderma*.

7. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o produto é uma enzima.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a enzima é uma celulase.

5 9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a biomassa de lignocelulose é rejeito de milho que não foi submetido a tratamento ácido prévio, a composição de enzima compreende uma lacase produzida por uma primeira espécie de *Trichoderma* ou uma espécie de *Stachybotrys*, e o micro-organismo cultivado na composição é uma se-  
10 gunda espécie de *Trichoderma*.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a primeira espécie de *Trichoderma* é *Trichoderma piluliferum*, a segunda espécie de *Trichoderma* é *Trichoderma reesei* e o produto é uma celulase.



*Fig.1*