



**INPI**  
INSTITUTO  
NACIONAL  
DE PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL  
Assinado  
Digitalmente

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

## **CARTA PATENTE Nº BR 112013008472-3**

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

**(21) Número do Depósito:** BR 112013008472-3

**(22) Data do Depósito:** 06/10/2010

**(43) Data da Publicação do Pedido:** 12/04/2012

**(51) Classificação Internacional:** C12P 19/02.

**(54) Título:** MÉTODO PARA MELHORAR A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NA SACARIFICAÇÃO DE UM MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E USO DE PELO MENOS UM AGENTE REDUTOR SELECIONADO A PARTIR DE OXIÂNIONS DE ENXOFRE E REAGENTES SULFIDRILÓ

**(73) Titular:** SEKAB E-TECHNOLOGY AB, Sociedade Sueca. Endereço: Box 286 örnköldsvik S-891 26, SUÉCIA(SE)

**(72) Inventor:** BJÖRN ALRIKSSON; LEIF JÖNSSON; VENKATA PRABHAKAR SOUDHAM.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 06/10/2010, observadas as condições legais

**Expedida em:** 27/11/2018

Assinado digitalmente por:

**Alexandre Gomes Ciano**

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**MÉTODO PARA MELHORAR A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NA  
SACARIFICAÇÃO DE UM MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E USO DE PELO  
MENOS UM AGENTE REDUTOR SELECIONADO A PARTIR DE OXIÂNIONS  
DE ENXOFRE E REAGENTES SULFIDRILO**

5        Campo da técnica da invenção

A presente invenção relata um método para melhorar a hidrólise enzimática na sacarificação de um material lignocelulósico pré-tratado. O método fornece açúcares que são úteis como substratos para a preparação de compostos  
10    alvo diferentes. O método é útil, *inter alia*, para o fabrico de um produto de fermentação, tais como etanol, a partir do material lignocelulósico.

Antecedentes da invenção

Biorrefinarias produtoras de commodities a partir de  
15    recursos renováveis oferecem uma alternativa para refinarias de óleo baseado em estoques de petróleo e permitir uma transição para a segurança energética melhorada. Materiais lignocelulósicos de silvicultura e agricultura são atraentes como matérias-primas, que são  
20    abundantes, relativamente barato, e não são usados para a alimentação. Lignocelulósicos consiste principalmente de lignina e de duas classes de polissacárideos, de celulose e hemicelulose. Os polissacárideos podem ser hidrolisados para os açúcares e convertidos em produtos de fermentação,  
25    tais como vários bioálcoois, em processos baseados em biocatalisadores, tais como industrialmente importante levedura de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*).

A hidrólise de celulose é geralmente precedida por um pré-tratamento, em que a hemicelulose se degrada e a  
30    celulose é feita cada vez mais acessíveis para as enzimas

celulolíticas ou hidrólises ácidas. A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é considerada o método mais promissor para obter um rendimento elevado de glicose a partir de celulose. Utilizando a hidrólise enzimática, 5 hidrólise e fermentação podem ser realizadas simultaneamente num processo de sacarificação e fermentação (SSF) ou em um bioprocessos consolidado (CBP). Alternativamente, a hidrólise separada e fermentação (SHF) podem ser usadas, o processo de configuração que pode 10 também incluir à hidrólise baseado enzimasna celulose.

Para obter rendimentos elevados de açúcares a partir de substratos lignocelulósicos, diluir o pré-tratamento de hidrólise ácida e/ou pré-tratamento com vapor, com catalisadores ácidos são considerados métodos de pré- 15 tratamento apropriados. Além disso, nos processos industriais para a conversão de biomassa lignocelulósica para produtos de fermentação, tais como o etanol celulósico, de toda a pasta obtida após pré-tratamento provavelmente será usada a uma alta concentração de 20 sólidos. No entanto, o pré-tratamento líquido é conhecido por inibir a hidrólise enzimática.

Anteriormente, a adição de agentes tensoativos tem sido considerada para melhorar a sacarificação enzimática de substratos celulósicos. Tensoativos provavelmente 25 prevenem a ligação improdutiva de enzimas para os complexos de substratos lignocelulósicos, tais como madeira pré-tratada. O benefício econômico da adição de tensoativos para misturas de reação destinadas à produção de sensível rendimento de produtos de baixo valor agregado tais como os 30 biocombustíveis líquidos, entretanto, tem sido questionado.

A adição de enzimas constitui uma parte considerável do total do custo do processo de produção de produtos a partir de material lignocelulósico. O custo para as enzimas é, por exemplo, considerado como um dos principais 5 obstáculos para a implementação industrial para a conversão de lignocelulose a biocombustíveis líquidos. Por conseguinte, seria desejável melhorar a eficiência da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, por exemplo, para obter mais açúcares a partir de certa dosagem 10 de enzima e período de tempo, ou para obter a mesma quantidade de açúcares a partir de uma dosagem baixa de enzima para o mesmo período de tempo. Também é desejável atingir certa quantidade de açúcares, com certa dosagem de enzima num curto período de tempo, uma vez que isto aumenta 15 a capacidade de produção e, assim, permite a produção melhorada e/ou diminuição dos custos de investimento. Melhorando a eficiência da hidrólise enzimática da celulose pode contribuir significativamente para a comercialização de produtos baseados em açúcares derivados de lignocelulose.

20        Sumário da invenção

É um objetivo da presente invenção a melhora da eficiência do processo de produção de açúcares e de produtos posteriores a partir de um material lignocelulósico.

25        É também um objeto da invenção melhorar a eficiência da hidrólise enzimática na sacarificação de materiais lignocelulósicos.

É um objeto da invenção aumentar a capacidade de produção da sacarificação de materiais lignocelulósicos.

30        É ainda um objetivo de melhorar a hidrólise

enzimática na sacarificação de materiais lignocelulósicos, na presença do líquido de pré-tratamento.

Para estes e outros objetos que serão evidentes a um perito na técnica a partir da seguinte divulgação, a presente invenção fornece de acordo com um primeiro aspecto, um método para melhorar a hidrólise enzimática na sacarificação de um material lignocelulósico, compreendendo: o pré-tratamento do material lignocelulósico a obter uma pasta de material lignocelulósico pré-tratado; adicionando pelo menos um agente redutor à pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou a fração líquida do mesmo a diminuir as propriedades inibitórias de hidrólise enzimática da pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou a fração líquida do mesmo, e sujeitando a pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou a fração de líquido do mesmo à hidrólise enzimática na presença de pelo menos um agente redutor.

Numa modalidade preferida, pelo menos um agente redutor é adicionado à pasta de material lignocelulósico pré-tratado, e a pasta de material lignocelulósico pré-tratada é submetida à hidrólise enzimática na presença de pelo menos um agente redutor.

Na modalidade preferida, o dito método é para a produção de um ou mais composto(s) alvo desejado a partir do material lignocelulósico e ainda compreende o passo de utilização do material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente como um substrato para a produção do composto(s) alvo.

Em certas modalidades preferidas, de um ou mais composto(s) alvo é um produto(s) de fermentação e o passo

de utilização do material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente compreende submeter o material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente a fermentação. Em modalidades específicas, o passo de  
5 hidrólise enzimática é realizado separadamente a partir do passo de fermentação. Noutras modalidades, a hidrólise enzimática e a fermentação são efetuadas simultaneamente num único passo. Em algumas modalidades, o dito produto(s) de fermentação incluindo um produto de fermentação  
10 selecionado a partir do grupo que consiste em etanol, butanol, e ácido succínico e é de preferência etanol.

Em certas outras modalidades preferidas do método de acordo com a invenção, o composto alvo é o ácido levulínico.

15 Numa modalidade preferida, pelo menos um agente redutor é selecionado a partir de oxiânions de enxofre, reagentes sulfidrilo, hidretos e oxidoredutases. Em modalidades específicas, pelo menos um agente redutor é selecionado a partir de sulfito de sódio, ditionito e  
20 ditiotreititol.

A presente invenção proporciona ainda de acordo com um segundo aspecto, um novo uso de pelo menos um agente redutor para reduzir as propriedades inibitórias de hidrólise enzimática de uma pasta de material  
25 lignocelulósico pré-tratado ou da fração líquida do mesmo.

Numa modalidade preferida, o dito uso é para diminuir as propriedades inibitórias de hidrólise enzimática de uma pasta de material lignocelulósico pré-tratada.

Numa modalidade preferida, pelo menos um agente  
30 redutor é selecionado a partir de oxiânions de enxofre,

reagentes sulfidrilo, hidretos e oxidoredutases. Em modalidades específicas, pelo menos um agente redutor é selecionado a partir de sulfito de sódio, ditionito e ditiotreitól.

5            Breve descrição dos desenhos

Fig. 1 é um gráfico que mostra os efeitos da adição de diferentes agentes redutores (15 mM) sobre a sacarificação de Avicel, a celulose microcristalina, depois de 120 h.

10           Fig. 2 é um gráfico que mostra os efeitos da adição de 15 mM de ditionito na sacarificação de uma pasta de Abeto pré-tratada.

Descrição detalhada da invenção

A invenção é geralmente baseada na constatação de que  
15 a hidrólise enzimática de substratos celulósicos, na presença da fração líquida obtida após pré-tratamento da lignocelulose pode ser melhorada pela adição de agentes redutores. Esta abordagem difere da adição de agentes conhecidos, tais como o ácido sulfúrico, dióxido de enxofre  
20 e sulfito, para o pré-tratamento fazer o pré-tratamento realizado a temperaturas elevadas e mais eficientes. A adição destes agentes em pré-tratamento utiliza as suas propriedades ácidas e alvos de substratos lignocelulósicos e a sua susceptibilidade à hidrólise enzimática, enquanto  
25 que a adição de agentes redutores após o pré-tratamento de acordo com a presente invenção é contemplada para os inibidores da enzima alvo do líquido de pré-tratamento. A presente abordagem difere também a partir da adição de agentes redutores para alcançar uma fermentabilidade  
30 melhorada das lignoceluloses hidrolisadas, uma vez que o

objetivo neste último caso é atenuar o efeito dos inibidores sobre o microorganismo de fermentação e não, como aqui divulgado, por hidrólise enzimática.

De acordo com um primeiro aspecto, é proporcionado um método para melhorar a hidrólise enzimática na sacarificação de um material lignocelulósico. Sacarificação refere à conversão ou a hidrólise do material lignocelulósico em mono- e dissacarídeos. A melhoria pode envolver, por exemplo, aumento da taxa de consumo de celulose, o aumento da quantidade total de açúcares produzidos durante o pré-tratamento e a hidrólise, aumentando o rendimento do açúcar na lignocelulose usada durante o pré-tratamento e de hidrólise, ou aumentando a produtividade volumétrica de químico alvo, por exemplo, medido como  $(\text{g químico alvo } \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1})$ . Também pode envolver a manutenção de um ou mais destes parâmetros usando uma concentração menor de enzima ou de um período de tempo mais curto no passo de hidrólise. No contexto da presente divulgação, "açúcares" referem à sacárideos fermentáveis, tais como monossacarídeos e dissacarídeos.

O método compreende os passos de pré-tratamento do material lignocelulósico a obter uma pasta de material lignocelulósico pré-tratado; adicionando pelo menos um agente redutor a pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou a fração líquida do mesmo paraa diminuir as propriedades inibitórias de hidrólise enzimática da pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou a fração líquida do mesmo, e sujeitando a pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou da fração líquida do mesmo a hidrólise enzimática na presença de pelo menos um agente redutor.



O método de acordo com a presente invenção é direcionado para o tratamento de materiais lignocelulósicos, tais como aparas de madeira. O termo materiais lignocelulósicos inclui material derivado de lignocelulose, isto é, material obtido a partir de material  
5 lignocelulósico, que compreende celulose, lignina e possivelmente hemicelulose. O material lignocelulósico derivado pode, por exemplo, ser derivados a partir de materiais de madeira ou resíduos florestais, tais como  
10 aparas de madeira, descartes de serrarias ou de fábricas de papel, ou resíduos agrícolas, por exemplo, milho. Como um exemplo, o material de lignocelulose derivado pode ser de material derivado de madeira ou de material derivado de bagaço de cana-de-açúcar. Dependendo da localização  
15 geográfica, madeira ou bagaço da cana de podem estar disponíveis em grandes quantidades, tornando-as atraentes como matérias-primas.

Lignocelulose consiste principalmente de lignina e de duas classes de polissacarídeos, celulose e hemicelulose.  
20 Na sacarificação de lignocelulose, os polissacarídeos são hidrolisados para açúcares, incluindo dissacarídeos e monossacarídeos. Como aqui usado, refere à sujeição à hidrólise do material lignocelulósico a condições de hidrólise tais que os açúcares livres tornam-se acessíveis  
25 num hidrolisado por tratamento adicional, por exemplo, fermentação. Os açúcares livres são úteis no fabrico de produtos desejados, tais como álcoois, de preferência etanol.

No método de acordo com a invenção, o material  
30 lignocelulósico é submetido a um pré-tratamento, em que a

hemicelulose é degradada e a celulose é feita cada vez mais acessível para as enzimas celulolíticas ou hidrólise ácida. Pré-tratando o material lignocelulósico refere à sujeição do material lignocelulósico a condições tais que a celulose torna-se mais acessível durante a hidrólise subsequente. O pré-tratamento pode envolver um ou vários métodos de pré-tratamento conhecido por um especialista. Como um exemplo, o pré-tratamento pode ser realizado a uma temperatura elevada com ácido, tipicamente um ácido mineral diluído, tal como ácido sulfúrico, ou um alcalino. O pré-tratamento pode envolver a impregnação, a qual refere à impregnação do material celulósico com um fluido de impregnação, seguida de aquecimento. No caso de pré-tratamento ácido, o fluido de impregnação pode ser uma solução ácida, tal como uma solução de ácido mineral. A impregnação pode ser realizada com um gás, tal como um gás SO<sub>2</sub> ou gás CO<sub>2</sub>, ou com a combinação de um gás com um líquido para obter, por exemplo, ácido sulfuroso ou ácido carbônico. A temperatura elevada pode ser atingida por vaporização, um processo usado para dirigir o ar para fora a partir da biomassa celulósica para facilitar a hidrólise da celulose. Vaporização é um método bem conhecido para pré-tratamento, por exemplo, biomassa lignocelulósica. Como outro exemplo, o pré-tratamento pode envolver a explosão de vapor, um processo que combina vapor, a libertações rápida de pressão e hidrólise para a ruptura das fibras celulósicas. Dependendo do tipo de pré-tratamento, pode ser desejável neutralizar o material lignocelulósico pré-tratado antes da hidrólise enzimática subsequente. Por exemplo, o material lignocelulósico pré-tratado pode ser neutralizado por meio

de um tampão ou uma adição de NaOH ou de amônia. Também,  $\text{CaOH}_2$  pode ser usado.

Um pré-tratamento preferido envolve sujeição do material lignocelulósico com ácido sulfúrico, o ácido sulfuroso ou dióxido de enxofre a uma temperatura elevada, por exemplo, na faixa de 120 a 220 °C, tipicamente durante 1 a 60 min.

O pré-tratamento fornece uma pasta de material lignocelulósico pré-tratado, em que a hemicelulose é degradada e a celulose é torna-se cada vez mais acessível para as enzimas celulolíticas ou hidrólise ácida. O teor de sólidos suspensos da pasta está tipicamente na faixa a partir de 5 a 40% (w/v), tal como de 8 a 30% (w/v), tal como de 12 a 20% (w/v). A presente invenção é baseada na observação de que a pasta tem propriedades inibitórias de hidrólise enzimática, e que esta propriedade inibitória reside na fração líquida da pasta. É possível separar as frações líquidas e sólidas da pasta obtida após pré-tratamento de matérias-primas lignocelulósicas e realizar a hidrólise enzimática na ausência da fração líquida. No entanto, é para fins práticos e para a eficiência do processo global e economia desejável utilizar toda a pasta de material lignocelulósico pré-tratado no subsequente processo de hidrólise enzimática.

Na sequência do pré-tratamento, o material lignocelulósico é submetido à hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática refere-se a uma reação de hidrólise catalisada por pelo menos uma enzima. Pelo menos uma enzima pode ser de pelo menos uma enzima de sacarificação, a qual se refere a, pelo menos, uma enzima que pode converter ou

hidrolisar a biomassa celulósica em sacárideos fermentáveis, tais como monossacarídeos e/ou dissacarídeos. Tais enzimas de sacarificação podem ser glicosidases, as quais hidrolisam os polissacarídeos. Exemplos de glicosidases incluem glicosidases celulose-hidrolisantes, tais como celulases, endoglucanases, exoglucanases, celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosidases, glicosidases hidrolisando hemicelulose, tais como as xilanases, endoxilanases, exoxilanases,  $\beta$ -xilosidases, arabinoxilanases, mananases, pectinases, galactanases e glucuronases, e glicosidases hidrolisando amido, tais como amilases,  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases, glucoamilases,  $\alpha$ -glicosidases e isoamilases, ou quaisquer enzimas no grupo de enzimas encontradas na EC 3.2.1. x, tal como EC 3.2.1.4, onde EC é o número Comissão Enzimática.

Numa modalidade, pelo menos uma enzima originada a partir de fungos filamentosos incluindo *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reseei*).

Tem agora, surpreendentemente, sido realizado que a inclusão de agentes redutores na hidrólise enzimática torna possível obter um processo mais eficiente de sacarificação enzimática na pasta de material lignocelulósico pré-tratado, ou a fração líquida do mesmo. Assim, as propriedades inibitórias de hidrólise enzimática da pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou a fração líquida do mesmo pode ser diminuída pela adição de pelo menos um agente redutor a pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou da fração líquida do mesmo.

No método de acordo com a invenção, a pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou da fração líquida

do mesmo é então submetido à hidrólise enzimática na presença de pelo menos um agente redutor. Este passo proporciona um material lignocelulósico sacarificado, por exemplo, mono- e dissacarídeos, que podem ser fermentados  
5 ou não, utilizados como substrato para a produção de compostos alvo desejados.

A fração líquida pode ser separada a partir da pasta de material lignocelulósico pré-tratado de várias formas que são conhecidas do especialista, por exemplo, permitindo  
10 que os sólidos assentar e decantação da fração líquida, por centrifugação, por filtração, ou combinações destes métodos. O teor de sólidos em suspensões da fração líquida é tipicamente inferior a 1,0% (w/v), tal como inferior a 0,5% (w/v), tal como inferior a 0,1% (w/v).

15 Numa modalidade, pelo menos um agente redutor é adicionado à fração líquida da pasta de material lignocelulósico pré-tratado. É Notado que, embora as celulasas em ato geral sobre o material da fase sólida, celobiasas são ativas na fase líquida. Consequentemente,  
20 numa modalidade, pelo menos um agente redutor é adicionado à fração líquida de material lignocelulósico pré-tratado, e a fração líquida é então submetida à hidrólise enzimática por celobiasas na presença de pelo menos um agente redutor.

Para fins práticos, no entanto, é conveniente, evitar  
25 processos de separação e de tratamentos separados para diferentes frações de material lignocelulósico pré-tratado. Numa modalidade preferida, pelo menos um agente redutor é adicionado à pasta de material lignocelulósico pré-tratado. A pasta de material lignocelulósico pré-tratado é então  
30 submetido à hidrólise enzimática na presença de pelo menos

um agente redutor.

Como mostrado nos Exemplos seguintes, os efeitos benéficos da adição de pelo menos um agente redutor ao material lignocelulósico pré-tratado, o qual é submetido à  
5 hidrólise enzimática são surpreendentes em pelo menos de duas maneiras: em primeiro lugar, a adição de agentes redutores foi observada ter um efeito negativo sobre a hidrólise enzimática da celulose em experimentos em que a fase líquida consistiu de um tampão de citrato aquoso, mas  
10 um efeito positivo no pré-tratamento da pasta de material lignocelulósico, ou na presença das porções líquidas da mesma. Sem desejar serem limitados a qualquer teoria específica, os resultados sugerem que os agentes redutores trabalham protegendo as enzimas a partir de compostos da  
15 presente invenção em que o líquido de pré-tratamento. Em segundo lugar, a adição do agente redutor após o pré-tratamento é benéfico para a hidrólise enzimática da pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou a fração líquida do mesmo independentemente do fato do dióxido/sulfito de  
20 enxofre tem sido usado no processo de pré-tratamento.

Um "agente redutor" refere-se a um agente químico capaz de provocar a redução de outra substância, como em si é oxidado, isto é, um agente químico capaz de doar um elétron numa reação de oxidação-redução. O agente redutor é  
25 compatível com os organismos de fermentação tais como leveduras.

Numa modalidade preferida, pelo menos um agente redutor é selecionado a partir de oxiânions de enxofre, reagentes sulfidrílo, hidretos e oxidoredutases. Numa  
30 modalidade preferida, o agente redutor de pelo menos um

composto de enxofre. Como um exemplo, pelo menos um agente redutor pode ser selecionado a partir de ditionito, sulfito e ditionitrol. Estes agentes redutores têm demonstrado serem adequados para reduzir a inibição da hidrólise enzimática, como mostrado nos Exemplos da presente divulgação. Ditionito e sulfito (sulfito de hidrogênio a pH usado para a sacarificação enzimática) são oxianions de enxofre. Sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), derivado a partir do gás de dióxido de enxofre ou de adição de sal, é usado em vários processos de larga escala industrial, incluindo o pré-tratamento de substratos lignocelulósicos. Ditionito ( $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ ) é um produto químico industrial usado na indústria de polpa e papel para o branqueamento redutivo e na indústria têxtil como um agente redutor no processo de tingimento. Portanto, ambos o sulfito e ditionito estão disponíveis em largas quantidades. Além disso, é para ser entendido que o agente redutor pode compreender sulfito e/ou ditionito na forma de sal, isto é, complexado com diferentes cátions. Exemplos incluem  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{NaHSO}_3$ ,  $\text{KHSO}_3$  e  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ . Ditionitrol (DTT), também conhecido como reagente de Cleland, representa compostos sulfidrilos. DTT é interessante, neste contexto, considerando que é conhecida a reduzir eficazmente ligações dissulfeto em proteínas. Os agentes redutores como o DTT poderiam, portanto, tentativamente ter um efeito prejudicial por desestabilização de proteínas com pontes de dissulfeto.

Como exemplo, o agente redutor pode ser ditionito e o ditionito pode ser adicionado numa quantidade tal que a concentração de ditionito durante a hidrólise enzimática é acima de 1 mM, tal como acima de 5 mM, ou na faixa de 1 a

30 mM, tal como 5 a 25 mM, tal como 7,5 a 20 mM. Como um exemplo adicional, o agente redutor é o sulfito e o sulfito é adicionado numa quantidade tal que a concentração de sulfito durante a hidrólise enzimática é acima de 1 mM, tal como acima de 5 mM, ou na faixa de 1 a 30 mM, tal como 5 a 25 mM, tal como 7,5 a 20 mM. Como ainda outro exemplo, o agente redutor é o ditioneitol e o ditioneitol é adicionado numa quantidade tal que a concentração de ditioneitol durante a hidrólise enzimática é acima de 1 mM, tal como acima de 5 mM, ou na faixa de 1 a 30 mM, tal como 5 a 25 mM, tal como 7,5 a 20 mM.

Estas concentrações de ditioneitol, sulfito e ditioneitol, respectivamente, têm demonstrado ser adequadas para diminuir a inibição da hidrólise enzimática, como mostrado nos Exemplos da presente divulgação. No entanto, pode ser desvantajoso para um subsequente processo de fermentação adicionar mais do que 100 mM de sulfito. Assim, as quantidades de agente redutor requeridas para atingir uma diminuição das propriedades inibitórias de hidrólise enzimática são relativamente baixas e os resultados a partir dos Exemplos da presente divulgação indicam que tais quantidades de agente redutor permite a produção de níveis elevados de açúcares.

Outros compostos que podem ser usados como agentes redutores incluem tiosulfatos ( $S_2O_3^{2-}$ ), tais como  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  e  $Na_2S_2O_3$ , açúcares alcalino-decompostos, ácido ascórbico, cisteína, dietanolamina, trietanolamina e glutathione reduzida.

Oxidations de enxofre, tais como o sulfito e ditioneitol, também pode eficientemente melhorar a



fermentabilidade das lignoceluloses hidrolisadas a níveis que dão rendimentos semelhantes de produto de fermentação, como são obtidos com fermentações de referência baseadas em soluções de açúcar sintético. A utilidade de oxianions de enxofre para melhorar a pré-tratamento e a fermentação, torna a abordagem para melhorar a eficiência da hidrólise enzimática aqui apresentada ainda mais atraente da perspectiva industrial, uma vez que a mesma substância química pode ser usada para finalidades diferentes em diferentes partes do processo.

Como estabelecido acima, o método da presente invenção proporciona um material lignocelulósico sacarificado, por exemplo, mono- e dissacarídeos, os quais podem ser fermentados ou por outro lado utilizados como substrato para a produção de compostos alvo desejados. Estes açúcares podem ser utilizados como substratos em vários métodos químicos e bioquímicos (por exemplo, enzimáticas) para produção de compostos alvo desejados. A título de exemplo, os açúcares podem ser usados em um processo termoquímico para produzir o ácido levulínico, o qual por sua vez é um intermediário na síntese de polímeros, plásticos e produtos farmacêuticos. Também é um precursor para a produção industrial de produtos químicos, tais como metiltetrahidrofurano, valerolactona e levulinato de etilo. De acordo com uma modalidade, o dito método envolve ainda o passo de utilização do material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente como um substrato para a produção de compostos alvo. Se a fração líquida tem sido separada a partir da pasta de material lignocelulósico pré-tratado antes da hidrólise

enzimática, a utilização adicional do material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente como um substrato para a produção de compostos alvo pode ser realizada com a fração líquida sozinha.

5 Alternativamente, a fração líquida pode ser combinada com a pasta inicial a partir do qual é derivada, pasta a qual também tem sido submetida à hidrólise enzimática, em seguida, ser sujeito a uso adicional.

O método da presente invenção também proporciona uma  
10 forma de atingir a sacarificação mais eficiente de lignocelulose no fabrico de produtos de fermentação a partir de lignoceluloses hidrolisadas. Exemplos de produtos de fermentação de acordo com a invenção incluem álcoois, ácidos, alcanos, alcenos, aromáticos, aldeídos, cetonas,  
15 biopolímeros, proteínas, peptídeos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos e outros produtos farmacêuticos. Numa modalidade, o produto de fermentação é selecionado a partir do grupo que consiste em etanol, butanol e ácido succínico. Um produto de fermentação preferido é o etanol.  
20 Consequentemente, o método de acordo com a invenção também proporciona para uma produção eficiente de combustíveis, tais como o etanol e outros produtos químicos a partir de materiais lignocelulósicos. De acordo com uma modalidade, o dito método é para melhorar a sacarificação de  
25 lignocelulose na produção de um produto de fermentação a partir de material lignocelulósico e ainda envolve o passo de sujeição do material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente a fermentação.

Se a fração líquida tem sido separada a partir da  
30 pasta de material lignocelulósico pré-tratados antes da

hidrólise enzimática, a fermentação adicional do material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente pode ser realizado com a fração líquida sozinha. Opcionalmente, a fração líquida fermentada pode então ser  
5 retornada para a pasta original e facilitar a libertação de monosacárideos a partir de sólidos na pasta. Alternativamente, a fração líquida pode ser combinada com a pasta original, a qual foi também submetida à hidrólise enzimática, e então, ser submetida à fermentação.

10 A fermentação do material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente pode ser realizada por um organismo de fermentação, a qual se refere a um organismo que é capaz de fermentar os açúcares, por exemplo, mono- ou dissacarídeos em um produto de fermentação. O organismo de  
15 fermentação pode ser de pelo menos um microorganismo eucariótico ou procariótico, tal como as bactérias e/ou leveduras. Exemplos de bactérias e leveduras, as quais são capazes de fermentar sacarídeos em compostos químicos, são conhecidos do especialista. As leveduras de *Saccharomyces*,  
20 *Pichia* e *Candida* podem ser usadas como o organismo de fermentação. O organismo de fermentação pode, por exemplo, ser do tipo selvagem, mutante ou recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*. Usando *S. cerevisiae* para a produção de um produto de fermentação é vantajoso uma vez  
25 que *S. cerevisiae* está bem estabelecida em relação à fermentação industrial e proporciona um elevado rendimento de produto.

Numa modalidade, a fermentação é uma sacarificação simultânea e fermentação (SSF) de um material  
30 lignocelulósico pré-tratado. Um processo SSF refere-se a um

processo em que a hidrólise enzimática e a fermentação é realizadas simultaneamente num fermentador. Assim, num processo SSF, sacárideos fermentáveis são preparados diretamente num fermentador por hidrólise enzimática do material lignocelulósico pré-tratado, e os sacárideos resultantes são convertidos em um produto de fermentação. Adicionalmente, a fermentação pode ser um bioprocesso consolidado (CBP), em que o biocatalisador que converte os monossacarídeos, também produz as enzimas capazes de hidrolisar o material lignocelulósico pré-tratado.

Numa outra modalidade, o hidrolisado que é submetido à fermentação, é obtido a partir da hidrólise enzimática do material lignocelulósico pré-tratado num passo separado do passo de fermentação. Consequentemente, a hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas em dois passos de processo separados (hidrólise separada e fermentação, SHF). Este, por exemplo, pode ser vantajoso se a reação de fermentação e a reação enzimática têm diferentes temperaturas ótimas. Como um exemplo, a temperatura durante a hidrólise enzimática pode ser mantida mais elevada do que a temperatura durante a fermentação, o que facilita o uso de enzimas termofílicas. Embora a hidrólise enzimática é geralmente realizada antes da etapa de fermentação, é notado que o material fermentado ou partes do mesmo, por exemplo, uma fração líquida, pode ser retornada para a pasta inicial e facilitar a libertação de monossacarídeos a partir dos sólidos na pasta, que pode então ser submetida a uma fermentação.

De acordo com um segundo aspecto, é proporcionado um novo uso de pelo menos um agente redutor para reduzir as

propriedades inibitórias de hidrólise enzimática de uma pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou da fração líquida da mesma. Numa modalidade preferida, pelo menos um agente redutor é útil especificamente para diminuir as

5 propriedades inibitórias de hidrólise enzimática de uma pasta de material lignocelulósico pré-tratado.

Como estabelecido acima, pelo menos um agente redutor é de preferência selecionado a partir de oxiânions de enxofre, reagentes sulfidrilo, hidretos e oxidoredutases,

10 tais como sulfito, ditionito e ditionotritol.

Os seguintes exemplos não limitativos irão ainda ilustrar a invenção.

#### Exemplos

Exemplo 1 - Pré-tratamento do material

15 lignocelulósico de Abeto

O pré-tratamento de aparas de madeira sem casca de Abetos da Noruega (*Picea abies*) foi realizado por meio de tratamento de um modo contínuo com o dióxido de enxofre a uma temperatura de 203 °C durante 5 min num reator de 30

20 litros. Um kg de dióxido de enxofre foi usado por 40 kg de aparas de madeira. Após o pré-tratamento, o pH da pasta era de 2 e o teor de matéria seca de 16%. A pasta de material pré-tratado foi arrefecida à temperatura ambiente e armazenado a 4 °C até seu uso adicional. Antes da inclusão

25 em misturas de reação, o pH da pasta foi ajustado para 5,2 usando 5 M solução de NaOH e a pasta foi diluída com água até atingir a concentração desejada de substrato celulósico.

A fração líquida do Abeto pré-tratado, a seguir

30 referida como líquido de pré-tratamento, foi obtida por

filtração. As concentrações de monossacarídeos, ácido acético e aldeídos furânicos no líquido de pré-tratamento foram: 22,7 g/l de manose, 18,4 g/l de glicose, 11,3 g/L de xilose, 5,6 g/l de galactose, 3,6 g/l de arabinose, 5,6 g/l de ácido acético, 3,6 g/l 5-hidroximetilfurfuralfurfural (HMF), e 2,1 g/l de furfural. Antes da inclusão nas misturas de reação, o pH do líquido de pré-tratamento foi ajustado a 5,2 usando de solução 5 M de NaOH.

Um bolo de filtro de madeira de Abeto pré-tratado foi obtido por filtração da pasta e lavagem da fração sólida com 4 a 5 volumes de água destilada. O bolo de filtro resultante foi então seco durante a noite numa estufa a 70 °C, moída usando um moinho analítico IKA A 11 basico (IKA, Staufen, Alemanha) e armazenado a temperatura ambiente até ser usado. O teor de matéria seca do bolo de filtração foi analisado usando um analisador de humidade (MJ 33, Mettler Toledo, Suíça).

#### Exemplo 2 - Sacarificação enzimática da celulose microcristalina

Experimentos de hidrólise foram conduzidos em 100 ml de E-balões, equipados com tampões de algodão e contendo misturas de reação com uma massa total de 25 g. As misturas continham um meio de reação ou líquido de pré-tratamento do Exemplo 1 ou uma solução tampão de 0,05 M de citrato, pH 5,2, 10% (w/w) de celulose microcristalina Avicel PH 101 (Fluka, Buchs, Switzerland), e 2% (w/w) de coquetel de enzima constituído por quantidades iguais de Celluclast 1.5 L e Novozyme 188 (ambas da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As atividades indicadas das preparações de enzima foram: Celluclast 1.5 L, a 700 unidades de endoglucanase

(EGU)/g; Novozyme 188, 250 unidades celobiase (CBU)/g. Algumas misturas contém também um dos seguintes agentes redutores (todos de grau de reagente): ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (Merck, Darmstadt, Germany), sulfito de sódio  
5 ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) (Merck), e ditionotritol (DTT) (Sigma-Aldrich), os quais foram adicionados a uma concentração final de 15 mM.

Os E-balões foram incubados durante 120 h, a 45 °C num agitador orbital (Ecotron incubator shaker, Infors, Bottmingen, Switzerland), estabelecido em 170 rpm. Durante a  
10 hidrólise, 100 µl de amostras foram coletadas depois de 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 h. No início e após a conclusão da hidrólise (isto é, a 0 e 120 h), 1,5 ml de amostras também foram tomadas.

As amostras foram arrefecidas no gelo e centrifugadas  
15 a 14 100 g durante 5 min. Os sobrenadantes foram coletados e sua concentração de glicose foi analisada usando um glicosímetro (Glucometer Elite XL, Bayer AG, Leverkusen, Germany). Análises do teor de açúcar de amostras selecionadas foram também realizadas usando cromatografia  
20 iônica (IC) e cromatografia a líquido de alto desempenho (HPLC). Os valores do glicosímetro, que têm uma precisão satisfatória, mas baixa correção, foram corrigidas através de dados obtidos por determinação cromatográfica da glicose. Os efeitos dos diferentes agentes redutores na  
25 sacarificação enzimática de Avicel são apresentados na Tabela 1 e na Fig. 1. Fig. 1 apresenta os efeitos de diferentes agentes redutores (15 mM) sobre a sacarificação de Avicel após 120 h, em que o líquido PT denota líquido de pré-tratamento, e as barras de erro indicam os desvios  
30 padrão.

Tabela 1. Efeitos de diferentes agentes redutores na sacarificação de Avicel

Agente redutor adicionado <sup>a</sup>	Meio	Concentração de glicose <sup>c</sup> (g/l)								
		Após 6 h	Após 12 h	Após 18 h	Após 24 h	Após 36 h	Após 48 h	Após 76 h	Após 96 h	Após 120 h
DTT	Tampão citrato	23,1 (0,2)	29,9 (0,2)	33,9 (<0,1)	35,4 (<0,1)	39,8 (0,8)	44,1 (0,5)	52,6 (0,2)	63,1 (0,8)	73,4 (1,6)
	Líquido PT <sup>b</sup>	9,2 (0,4)	12,1 (0,2)	16,3 (0,8)	18,4 (0,8)	19,6 (0,2)	23,1 (0,2)	30,1 (1,0)	40,0 (1,2)	43,3 (0,5)
Sulfito	Tampão citrato	10,7 (0,2)	15,2 (0,2)	20,9 (0,6)	23,0 (0,6)	25,8 (0,2)	31,5 (0,2)	40,2 (0,6)	44,8 (1,6)	51,6 (1,6)
	Líquido PT <sup>b</sup>	8,9 (<0,1)	14,5 (0,8)	18,5 (0,2)	19,3 (0,2)	21,6 (0,2)	26,1 (0,2)	33,3 (0,2)	42,1 (0,8)	48,7 (0,5)
Ditionito	Tampão citrato	13,9 (0,2)	19,2 (0,2)	26,7 (0,5)	28,6 (0,8)	31,9 (0,8)	36,1 (1,2)	45,8 (1,1)	54,8 (1,2)	63,9 (0,4)
	Líquido PT <sup>b</sup>	10,5 (0,2)	17,0 (0,2)	20,9 (0,5)	22,0 (<0,1)	23,8 (0,4)	27,5 (0,8)	33,0 (<0,1)	39,6 (1,4)	41,6 (0,7)
Nenhum	Tampão citrato	20,5 (0,5)	29,9 (0,2)	36,7 (0,5)	40,0 (0,2)	45,1 (0,5)	53,0 (0,2)	60,0 (1,2)	75,4 (0,4)	84,8 (<0,1)
	Líquido PT <sup>b</sup>	8,6 (0,2)	14,4 (1,0)	16,4 (0,6)	17,7 (<0,1)	19,9 (0,2)	21,8 (0,8)	25,3 (<0,1)	27,4 (1,2)	31,7 (0,8)

<sup>a</sup> Avicel foi hidrolisado na presença ou ausência de 15 mM dos agentes redutores.

<sup>b</sup> líquido PT = líquido de pré-tratamento

<sup>c</sup> Produção de glicose calculada como a média de experimentos duplicada para cada reação.

A tabela mostra a glicose gerada durante o experimento, com o teor inicial de glicose do líquido de pré-tratamento deduzido. Desvios padrões são mostrados entre parênteses.

Os agentes redutores podem tentativamente ter um efeito prejudicial por proteínas desestabilizadoras com



pontes de dissulfeto. De fato, todos os três agentes redutores estudados tiveram um efeito negativo sobre a hidrólise enzimática da celulose em experimentos nas quais a fase líquida consistiu de um tampão de citrato aquoso.

5 Após 120 h, a geração de glicose a partir de Avicel foi 13 a 39% mais baixos na presença de 15 mM de um agente redutor do que em reações de controle sem agente redutor. Sulfito teve o efeito mais prejudicial, seguido por ditionito, e, em seguida, DTT.

10 Na presença de líquido de pré-tratamento de madeira de Abeto, a inclusão de agentes redutores, surpreendentemente, teve um efeito positivo sobre a hidrólise da celulose. A adição de 15 mM de agente redutor resultou na produção elevada de glicose de 31 a 54% a  
15 partir de Avicel após 120 h. Sulfito deu a maior concentração de glicose, seguido de DTT, e depois ditionito. A melhoria atingida com os diferentes agentes redutores não foi inversamente relacionada com o impacto negativo sobre a hidrólise enzimática no sistema tampão de  
20 citrato. Apesar do fato de sulfito ter o maior impacto negativo, deu a maior concentração de glicose final (Tabela 1, Fig. 1.). Os efeitos negativos da mudança de um regime de tampão de citrato a um regime de líquido de pré-tratamento variou de 63% de redução da produção de glicose  
25 após 120 h para o controle sem agente redutor, a 41% para DTT, 35% para ditionito, e 6% para sulfito.

#### Exemplo 3 - sacarificação enzimática da pasta de Abeto pré-tratado

Experimentos de hidrólise foram conduzidos em 100 ml  
30 de E-balões, equipados com tampões de algodão e contendo

misturas de reação, com uma massa total de 25 g. As misturas continham uma pasta de Abeto pré-tratado do Exemplo 1 foi ajustado a 10% (w/w) de sólidos, pH 5,2, e 0,5, 1,2 ou 4% (w/w) de coquetel de enzima constituído por quantidades iguais de Celluclast 1.5 L e Novozyme 188. A hidrólise enzimática foi realizada na presença ou ausência de 15 mM de ditionito.

Os E-balões foram incubados durante 120 h, a 45 °C num agitador orbital estabelecido a 170 rpm. Durante a hidrólise, a 100 µl de amostras foram coletadas após 6, 24, 48, 76, 96 e 120 h. No início e após a conclusão da hidrólise (isto é, a 0 e 120 h), 1,5 ml de amostras também foram tomadas.

As amostras foram arrefecidas no gelo e centrifugadas a 14 100 g durante 5 min. Os sobrenadantes foram coletados e a sua concentração de glicose foi analisada usando um glicosímetro. Análises do teor de açúcar de amostras selecionadas foram também realizados usando IC e HPLC. Os valores do glicosímetro foram corrigidos usando dados obtidos por determinação cromatográfica da glicose. Os efeitos do agente redutor ditionito de sacarificação da pasta de Abeto pré-tratado para várias cargas de enzimas estão apresentados na Tabela 2 e fig. 2. Na fig. 2, os efeitos da adição de 15 mM de ditionito (barras negras) em sacarificação de uma pasta de Abeto pré-tratado com 4% de carga de enzima é mostrado, comparado com nenhuma adição de um agente redutor (barras brancas). As barras de erro indicam os desvios padrão.

Tabela 2. Sacarificação da pasta de Abeto pré-tratado com a carga de enzima diferente		
Carga de enzima %	Agente redutor adicionado <sup>a</sup>	Concentração de Glicose <sup>b</sup> (g/l)

(w/w)		Após 6 h	Após 24 h	Após 48 h	Após 76 h	Após 96 h	Após 120 h
4	Ditionito	16,7 (0,2)	33,4 (0,5)	44,7 (0,6)	58,9 (0,2)	70,1 (0,2)	82,5 (0,2)
	nenhum	17,1 (0,4)	29,2 (0,4)	37,1 (0,5)	44,6 (0,8)	53,1 (0,6)	71,1 (0,2)
2	Ditionito	11,4 (0,5)	22,4 (0,8)	31,2 (0,4)	40,7 (0,2)	49,0 (1,4)	57,5 (0,9)
	Nenhum	11,9 (0,2)	20,4 (0,2)	27,9 (0,2)	36,6 (0,6)	42,0 (0,4)	51,0 (1,0)
1	Ditionito	6,2 (0,2)	15,4 (0,2)	23,1 (0,2)	29,9 (0,2)	36,7 (2,2)	45,8 (1,1)
	Nenhum	5,2 (0,5)	13,5 (0,2)	19,6 (0,6)	25,7 (1,0)	31,3 (0,5)	40,0 (2,2)
0.5	Ditionito	4,1 ( $<0,1$ )	10,4 (0,6)	17,1 (0,4)	23,0 (0,4)	27,9 (0,9)	35,0 (2,3)
	Nenhum	3,4 (0,8)	8,9 (0,8)	14,5 (0,8)	20,2 (2,1)	23,9 (2,3)	30,1 (2,8)
<p><sup>a</sup> Pasta de madeira de Abeto pré-tratado foi hidrolisado na presença ou ausência de 15 mM de ditionito.</p> <p><sup>b</sup> Produção Glicose calculada como a média de experimentos duplicada. A tabela mostra a glicose gerada durante o experimento, com o teor de glicose inicial do líquido de pré-tratamento deduzido. Desvios padrões são mostrados entre parênteses.</p>							

Independentemente da carga de enzima, a inclusão de ditionito sempre resultou em maior rendimento de glicose final. A melhora comparada com as reações, sem qualquer agente redutor adicionado foi de 13 a 16%, após 120 h.

5 Estes valores são inferiores do que o efeito positivo de ditionito em Avicel (Exemplo 2, Tabela 1), a qual era de 31% após 120 h. No entanto, uma vez que a pasta foi diluída

com água até atingir a concentração de 10% do substrato celulósico, a mistura de reação com a pasta continha menos líquido de pré-tratamento do que as reações comparáveis com Avicel. Além disso, após 76 e 96 h, a melhoria com ditionito atingiu 32% no experimento com 4% de carga de enzima (Tabela 2, Fig. 2.). Carga de enzima elevada deu concentrações elevadas de glicose, mas o experimento mostra que, se um agente redutor é adicionado após o pré-tratamento, é possível reduzir a carga de enzima e ainda obter um rendimento de açúcar similar.

O processo de pré-tratamento do Exemplo 1, designado para melhorar a digestibilidade enzimática de madeira macia, foi realizada a uma temperatura elevada ( $> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) com adição de dióxido de enxofre, o qual forma sulfito numa solução aquosa. O fato que a adição de ditionito após pré-tratamento resultou numa melhorada hidrólise enzimática a apenas  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  indicada que a adição do agente redutor, após o pré-tratamento é benéfico para a hidrólise enzimática, mesmo se o dióxido/sulfito de enxofre tem sido usado no processo de pré-tratamento.

#### Exemplo 4 - Sacarificação enzimática do bolo de filtração de Abeto pré-tratado

Experimentos de hidrólise foram conduzidos em 100 ml de E-balões, equipados com tampões de algodão e contendo misturas de reação, com uma massa total de 25 g. As misturas continham como um meio de reação ou líquido de pré-tratamento do Exemplo 1, ou uma solução tampão de 0,05 M de citrato, pH 5,2, 10% (w/w) de bolo de filtro de madeira de Abeto pré-tratado como substrato celulósico, e 2% (w/w) de coquetel de enzima, com quantidades iguais de

Celluclast 1.5 L e Novozyme 188. A hidrólise enzimática foi realizada na presença ou ausência de 15 mM de ditionito.

Os E-balões foram incubados durante 120 h, a 45 °C num agitador orbital ajustado a 170 rpm. Durante a hidrólise, a 100 µl de amostras foram coletadas após 6, 12, 24, 36, 48, 76, 96 e 120 h. No início e após a conclusão da hidrólise (isto é, a 0 e 120 h), 1,5 ml de amostras também foram tomadas.

As amostras foram arrefecidas no gelo e centrifugadas a 14 100 g durante 5 min. Os sobrenadantes foram coletados e a sua concentração de glicose foi analisada usando um glicosímetro. Análises do teor de açúcar de amostras selecionadas foram também realizadas usando IC e HPLC. Os valores do glicosímetro foram corrigidos usando dados obtidos por determinação cromatográfica da glicose. Os efeitos do agente redutor ditionito na sacarificação enzimática de madeira de Abeto pré-tratado são apresentados na Tabela 3.

<b><u>Tabela 3. Sacarificação Enzimática do bolo de filtro de madeira de Abeto pré-tratado</u></b>									
<b>Meio</b>	<b>Agente redutor adicionado<sup>a</sup></b>	<b>Concentração de Glicose<sup>b</sup> (g/l)</b>							
		<b>Após</b>	<b>Após</b>	<b>Após</b>	<b>Após</b>	<b>Após</b>	<b>Após</b>	<b>Após</b>	<b>Após</b>
		<b>6 h</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>	<b>36 h</b>	<b>48 h</b>	<b>76 h</b>	<b>96 h</b>	<b>120 h</b>
<b>Tampão citrato</b>	<b>Ditionito</b>	8,6 (0,2)	12,3 (0,2)	16,3 (0,4)	19,7 (0,4)	21,8 (0,4)	24,3 (0,2)	27,4 (0,5)	31,0 (0,6)
	<b>Nenhum</b>	9,9 (0,2)	12,8 (0,5)	16,3 (0,6)	19,2 (0,2)	20,9 (0,6)	23,1 (0,5)	25,7 (0,5)	29,0 (0,2)
<b>Líquido PT</b>	<b>Ditionito</b>	6,4 (0,2)	10,2 (0,4)	11,8 ( $<0,1$ )	15,5 (0,2)	16,8 (0,2)	18,2 (0,6)	21,1 (0,4)	24,7 (1,1)
	<b>Nenhum</b>	5,4 (0,2)	6,4 (0,2)	7,9 (0,5)	11,3 (0,4)	12,5 (0,2)	13,5 (0,6)	15,4 (0,2)	18,6 ( $<0,1$ )

<sup>a</sup> bolo de filtro de madeira de Abeto foi hidrolisado na presença ou ausência de 15 mM ditionito.

<sup>b</sup> Produção de glicose calculada como a média de experimentos duplicada. A tabela mostra a glicose gerada durante o experimento, com o teor da glicose inicial

do líquido de pré-tratamento deduzido. Desvios padrões são mostrados dentro parênteses.

<sup>c</sup> líquido PT = líquido de pré-tratamento

A produção de glicose a partir do bolo de filtro lavado e moído foi melhorada em 7% após 120 h por adição de ditionito a misturas de reação com tampão de citrato. Que é diferente a partir do experimento com celulose microcristalina (Avicel, Exemplo 2, Tabela 1), onde a adição de ditionito de um regime de tampão de citrato resultou na produção de glicose reduzida. A presença do material lignocelulósico no bolo de filtro lavado e moído pareceu aliviar os efeitos negativos do agente redutor sobre a hidrólise enzimática na ausência de líquido de pré-tratamento. O processo de pré-tratamento que degradam a hemicelulose na madeira de abeto, a qual é também evidente a partir da formação de manose, xilose, e outros compostos derivados de hemicelulose no líquido de pré-tratamento. No entanto, a maior parte da lignina seria deixada na fração sólida em conjunto com a celulose, e, provavelmente, também alguns extrativos lipofílicos. Além disso, apesar de que o bolo de filtro foi lavado com água, pode haver alguns compostos de baixa massa molecular gerados durante o processo de pré-tratamento que, no entanto, ficar com a fração sólida por interações hidrofóbicas. A composição

química do material do bolo de filtração é, portanto, bastante diferente do que a de Avicel, a qual consiste simplesmente em celulose microcristalina. Esta diferença na composição química pode explicar os efeitos observados para  
5 diferentes regimes de ditionito no tampão de citrato.

Na presença do líquido de pré-tratamento, a melhoria na produção de glicose, que resultou a partir da inclusão de ditionito atingiu 33%, após 120 h. Esta melhoria foi semelhante para as melhorias causadas por ditionito nos  
10 experimentos com celulose microcristalina (Avicel) no líquido de pré-tratamento (Exemplo 2, Tabela 1).

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para melhorar a hidrólise enzimática na sacarificação de um material lignocelulósico, caracterizado por compreender:

5        pré-tratamento do material lignocelulósico para obter uma pasta de material lignocelulósico pré-tratado;

          adição de pelo menos um agente redutor selecionado a partir de oxiânions de enxofre e reagentes sulfidrilo à pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou à fração  
10    líquida do mesmo para diminuir as propriedades inibitórias de hidrólise enzimática da pasta do material lignocelulósico pré-tratado ou da fração de líquido da mesma; e

          sujeição da pasta de material lignocelulósico pré-  
15    tratado ou da fração líquida da mesma à hidrólise enzimática na presença do pelo menos um agente redutor.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um agente redutor é adicionado à pasta de material lignocelulósico  
20    pré-tratado, e a pasta de material lignocelulósico pré-tratado é submetida à hidrólise enzimática na presença do pelo menos um agente redutor.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito método é para a  
25    produção de um ou mais composto(s) alvo desejado(s) a partir do material lignocelulósico e que compreende ainda a etapa de

          utilização do material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente como um substrato para a  
30    produção do(s) composto(s) alvo.



4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o um ou mais composto(s) alvo é um produto(s) de fermentação, e a etapa de utilização do material lignocelulósico pré-tratado e  
5 hidrolisado enzimaticamente é compreendida de

sujeição do material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente à fermentação.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a etapa de hidrólise  
10 enzimática é realizada separadamente da etapa de fermentação.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a hidrólise enzimática e a fermentação são realizadas simultaneamente numa única  
15 etapa.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o dito produto(s) de fermentação inclui um produto de fermentação selecionado a partir do grupo que consiste em  
20 butanol, etanol e ácido succínico.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dito produto de fermentação é o etanol.

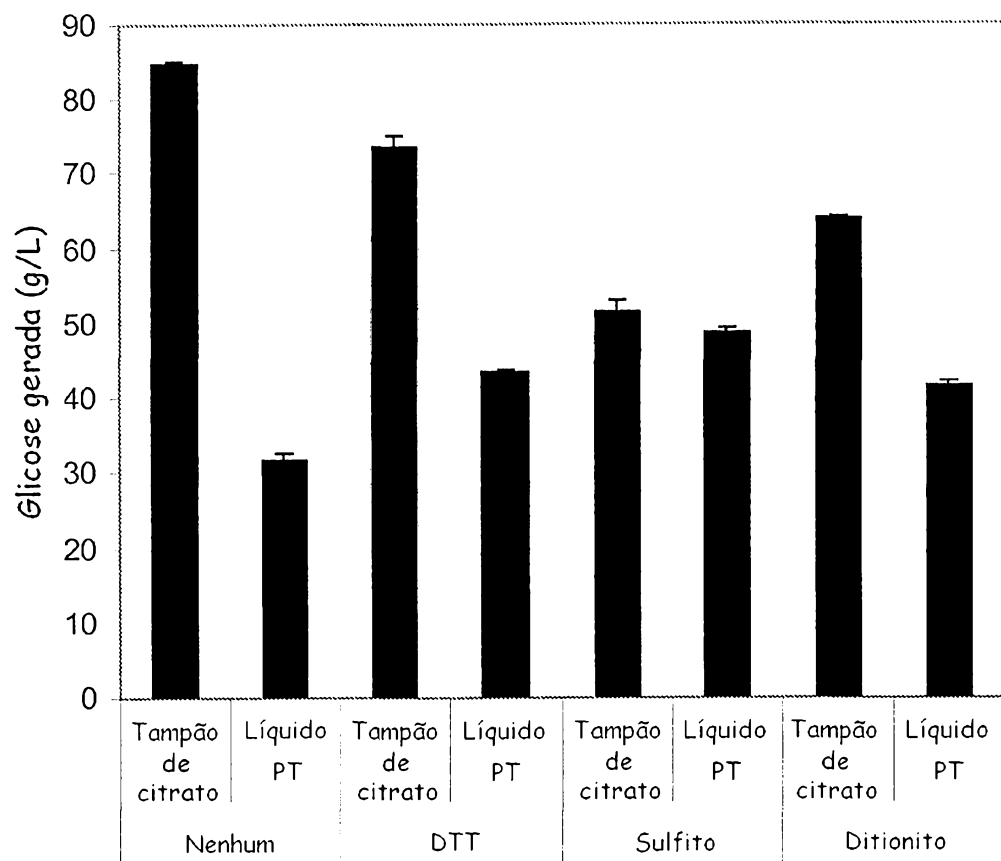
9. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o composto alvo é o ácido levulínico.  
25

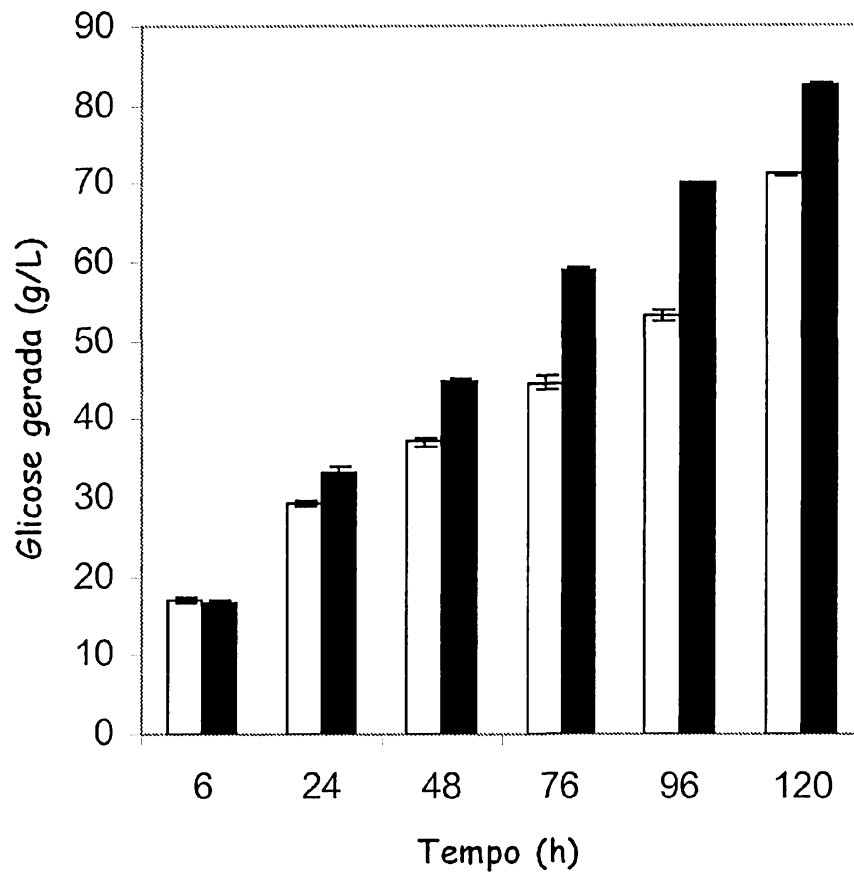
10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um agente redutor é selecionado a partir de sulfito, ditionito e  
30 ditiotreitól.

11. Uso de pelo menos um agente redutor selecionado a partir de oxiânions de enxofre e reagentes sulfidrilo, caracterizado pelo fato de ser para reduzir as propriedades inibitórias de hidrólise enzimática de uma pasta de material lignocelulósico pré-tratado ou da fração líquida da mesma.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de ser para diminuir as propriedades inibitórias de hidrólise enzimática de uma pasta de material lignocelulósico pré-tratado.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um agente redutor é selecionado a partir de sulfito, ditionito e ditiotreitól.

**Fig 1**



**Fig 2**