

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

(21) **PI0711372-2 A2**

(22) Data de Depósito: 12/05/2007
(43) Data da Publicação: 01/11/2011
(RPI 2130)



(51) *Int.Cl.:*
C07H 1/06
C12P 3/00

(54) Título: PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO POR VIA ENZIMÁTICA ARTIFICIAL

(30) Prioridade Unionista: 11/05/2007 US 11/747,496,
12/05/2006 US 60/799,685

(73) Titular(es): Virginia Tech Intellectual Properties, Inc

(72) Inventor(es): Jonathan Mielenz, Yi-Heng Percival Zhang

(74) Procurador(es): Soerensen Garcia Advogados Associados.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007068829 de
12/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/134268 de
22/11/2007

(57) Resumo: PRODUÇÃO DE BIOHIDROGENIO POR VIA ENZIMATICA ARTIFICIAL. A presente invenção compreende um processo enzimático invitro que converte efetivamente polissacarídeos renováveis em altos rendimentos de hidrogênio em condições brandas, usando apenas enzimas e água. O processo compreende uma quantidade de enzimas (1) fosforilases, (2) fosfoglucomutases, (3) hidrogenases, e (4) enzimas envolvidas na via de pentose-fosfato. Modalidades preferidas do processo produzem apenas hidrogênio e dióxido de carbono como produtos puros, traduzindo-se em um método econômico de gerar hidrogênio em quantidades muito grandes a partir de matérias-primas de baixo custo.



PI0711372-2

RELATÓRIO DESCRITIVO

Pedido de Patente de Invenção para: "**PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO POR VIA ENZIMÁTICA ARTIFICIAL**".

Referência cruzada com pedidos relacionados

5 Este pedido baseia-se na divulgação de, e reivindica
prioridade relativa ao pedido de patente dos E.U.A. número
11/747,496, depositado em 11 de maio de 2007, e pedido de
patente provisional dos E.U.A. número 60/799,685, depositado em
12 de maio de 2006, sendo que os teores integrais de ambos são
10 incorporados aqui por referência.

Fundamentos da invenção

Campo da invenção

A presente invenção refere-se à biotecnologia nos campos da
agricultura e da produção de energia. Mais especificamente, a
15 presente invenção refere-se à produção de hidrogênio a partir de
polissacarídeos renováveis por meio de catálise enzimática de
polissacarídeos substancialmente em hidrogênio e dióxido de
carbono.

Discussão da arte relacionada

20 A alteração climática e a eventual depleção das reservas de
combustível fóssil do mundo estão ameaçando o desenvolvimento
sustentável (Morris, 2006; Hoffert et al., 2002; Farrell et al.,
2006). O hidrogênio é um portador de energia móvel e é
abundante, limpo, e evidentemente não contém carbono. De acordo
25 com o Departamento de Energia dos Estados Unidos (2004),
prioridades de pesquisa e desenvolvimento [R&D] para a futura

economia de hidrogênio incluem (i) reduzir os custos da produção de hidrogênio, (ii) encontrar métodos viáveis para armazenamento de hidrogênio de alta densidade, (iii) estabelecer uma infraestrutura segura e efetiva para o fornecimento contínuo de hidrogênio desde a produção, ao armazenamento até o uso, e (iv) reduzir drasticamente os custos de células combustíveis e aperfeiçoar sua durabilidade.

O hidrogênio é uma alternativa muito promissora para armazenar energia ao invés de se empregar combustíveis fósseis. O hidrogênio pode ser usado em uma célula combustível, que é um dispositivo eletroquímico que converte a energia química de uma reação diretamente em energia elétrica. Uma célula combustível é um dispositivo altamente eficiente para gerar energia e calor. Células combustíveis oferecem o potencial de diminuir significativamente a dependência de combustíveis fósseis. No entanto, o fornecimento de combustível é um dos maiores obstáculos que impedem a comercialização amplamente disseminada de dispositivos do tipo referido.

A maior parte das células combustíveis opera usando gás hidrogênio como o reagente, geralmente preparado reformando-se (convertendo) um composto de hidrogênio. Combustíveis fósseis ricos em hidrogênio são reformados comumente usando-se reforma de vapor catalítica, reforma auto-térmica, ou reforma de oxidação parcial catalítica. No entanto, para que a tecnologia de células combustíveis possa sustentar nossas necessidades de energia, são exigidas fontes renováveis de hidrogênio. Exemplos

de geração de hidrogênio não-baseada em combustível fóssil incluem eletrólise de água usando energia solar ou eólica, energia hidráulica, ou energia geotérmica; separação termoquímica de água; gases residuais em sítios industriais; 5 gaseificação de biomassa; e sistemas bio- ou fotobiológicos que produzem gás hidrogênio quando da digestão de componentes orgânicos ou quando da absorção de luz solar.

Diferentemente da eletricidade, que precisa ser usada da forma como é produzida, o hidrogênio pode ser armazenado até ser 10 necessário. No entanto, a baixa densidade do hidrogênio traduz-se em uma baixa densidade de energia, particularmente em comparação com combustíveis tradicionais. Mesmo considerando a maior eficiência de uma célula combustível em comparação com métodos tradicionais de geração de energia, a baixa densidade de 15 energia do hidrogênio determina métodos de transporte e armazenamento potencialmente inibidores.

Polissacarídeos podem ser um bom meio de armazenamento para o hidrogênio porque polissacarídeos contêm cerca de 6,2 % em massa de H_2 por unidade de açúcar, e quando reage com água, pode 20 produzir 12 moles de dihidrogênio. Assim, a capacidade de armazenamento potencial de hidrogênio é em torno de 15 %. Um material com capacidade de 15 % de armazenamento de hidrogênio excede até mesmo objetivos de longo prazo para tecnologias de armazenamento de hidrogênio, de acordo com os objetivos do 25 Departamento de Energia dos E.U.A. (Schlapbach e Zuttel, 2001). Para extrair efetivamente o hidrogênio de polissacarídeos e

água, precisa ocorrer a reação global $C_6H_{10}O_5 + 7 H_2O \rightarrow 6 CO_2 + 12 H_2$, sendo que $C_6H_{10}O_5$ representa unidades repetitivas de glucano contidas na biomassa, como amido ou celulose.

Tem havido vários paradigmas para converter biomassa a hidrogênio:

(1) gaseificação direta de polissacarídeo (Antal et al., 2000);
(2) catálise química direta de glicose (Cortright et al., 2002; Huber et al., 2003); (3) fermentação anaeróbica (Das e Veziroglu, 2001; Hallenbeck e Benemann, 2002); e (4) fermentação de etanol (Lynd et al, 2002; Zhang et al, 2006; Zhang e Lynd, 2004) seguido de reforma de etanol (Deluga et al, 2004). Os métodos químicos convencionais apresentam baixos rendimentos de hidrogênio (<60 %) e requerem elevadas temperaturas de reação (p. ex., de 500 a 900 K) (Antal et al, 2000; Cortright et al, 2002; Huber et al, 2003). A fermentação anaeróbica de hidrogênio é bem conhecida em virtude da baixa eficiência com um rendimento máximo de 33 % (Das e Veziroglu, 2001; Hallenbeck e Benemann, 2002). A combinação de fermentação de etanol e reforma pode produzir 10 H_2 por unidade de glicose (83 % de rendimento). Considerando de 5 a 10 % de perda de fermentação e em torno de 5 % de perda de reforma (Deluga et al, 2004), o rendimento prático de hidrogênio através do etanol poderia ser de aproximadamente 75 % do rendimento máximo (sendo que o rendimento máximo é de 12 H_2 por unidade de glicose).

O armazenamento e a distribuição de polissacarídeos sólidos a serem convertidos a hidrogênio poderia enfrentar muitos

desafios da arte do hidrogênio hoje em dia. Se fosse possível usar um processo e dispositivo práticos diretamente em aplicações móveis *on board*, como em veículos, seria possível resolver vários problemas associados com dispositivos de armazenamento de hidrogênio. Desta forma poderia se evitar a perda de energia para a compressão ou liquefação do hidrogênio. Adicionalmente, não seriam mais necessárias temperaturas elevadas para a dessorção de H_2 . Adicionalmente, a vida útil de materiais de armazenamento de hidrogênio sólido e o tempo de recarga do hidrogênio não representam mais problemas para aplicações práticas. Da mesma forma, o armazenamento e a distribuição de carboidrato é muito segura em comparação com hidrogênio gasoso.

A via bioquímica para a produção de hidrogênio molecular a partir de hidrogênio elementar é conhecida. Um elétron no fotossistema I (quer seja fotossistema I isolado ou fotossistema I em tilacóides) é excitado, tipicamente pela luz, a uma energia maior, resultando na doação de um elétron a um portador de elétron exógeno que, por sua vez, pode transferir elétrons para a enzima hidrogenase. Neste processo, o fotossistema I oxidado pode extrair então um elétron de um doador de elétrons, seja diretamente ou através de uma cadeia de transferência de elétrons, como aquela encontrada na membrana tilacóide. Onde a água atua como o doador de elétron, a cadeia de transferência de elétron inclui o fotossistema II. Enquanto isso, duas moléculas portadoras de elétrons reduzidas são capazes de doar elétrons à

enzima hidrogenase. A hidrogenase combina dois elétrons com dois prótons para formar uma molécula de hidrogênio.

Organismos fotossintéticos aeróbicos produtores de oxigênio, ou componentes subcelulares de referidos organismos, têm sido
5 usados previamente para preparar gás hidrogênio (Benemann et al., 1973; Rosen e Krasna, 1980; Rao et al., 1978). Os componentes de sistemas isentos de células (i.e., *in vitro*) reportados nestas referências requerem tilacóides isolados ou fotossistema I solubilizado de tilacóides; um doador de elétron,
10 como água ou um doador de elétron artificial, como ditiotreitól ou ácido ascórbico; uma hidrogenase capaz de aceitar elétrons do fotossistema I que pode catalisar a combinação de dois elétrons e dois prótons para formar hidrogênio molecular quando elétrons são recebidos de um doador de elétron que pode ser oxidado pela
15 hidrogenase; e um suporte de elétron exógeno que é capaz de aceitar elétrons do fotossistema I e que pode doar elétrons à hidrogenase.

Pelo menos dois grupos de organismos fotossintéticos produtores de oxigênio são capazes de produzir hidrogênio *in*
20 *vivo*. Estes incluem cianobactérias e algas verdes. Cianobactérias geralmente usam a enzima nitrogenase para produzir hidrogênio molecular. Elétrons usados neste processo de produção de hidrogênio molecular são derivados de carboidrato armazenado e são usados para reduzir ferredoxina, que é o doador de elétron
25 imediato para nitrogenase (Markov et al., 1995). A hidrogenase também pode catalisar a produção de hidrogênio molecular em

cianobactérias. Em cianobactérias, a produção de hidrogênio molecular é inibida pelo oxigênio e/ou pela luz.

Algas verdes também podem foto-emitir (i.e., produzir) hidrogênio molecular via hidrogenase. A via da transferência de elétron é presentemente desconhecida. Mostrou-se que a fonte de elétrons para o processo é o carboidrato fermentado endógenamente (Klein e Betz, 1978). A produção de hidrogênio para na presença de dióxido de carbono (Vatsala e Seshadri, 1985), indicando que o sorvedouro de elétrons da redução de dióxido de carbono é um competidor melhor para o fluxo de elétrons fotossintético do que a hidrogenase.

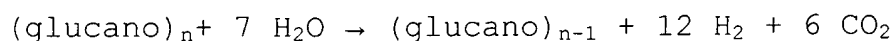
O hidrogênio molecular (H_2) possui vários usos comerciais. O hidrogênio molecular é usado para a produção de amônia; no refino do petróleo, onde o H_2 é usado por toda uma refinaria típica; nas indústrias de síntese química, quando se deseja a conversão de uma dupla ligação carbono-carbono a uma ligação simples C-C, ou de uma tripla ligação carbono-carbono a uma ligação simples ou uma dupla ligação; na indústria de alimentos para a hidrogenação de óleos vegetais; e na fabricação de circuitos eletrônicos. O hidrogênio também é usado extensivamente hoje em dia para preparar metanol, fertilizantes, vidro, metais refinados, vitaminas, cosméticos, sabões, lubrificantes, e limpadores. Adicionalmente, o hidrogênio puro é um combustível excelente, tanto em motores de combustão tradicionais, como também em células combustíveis, e produz apenas vapor d'água quando oxidado com oxigênio. O hidrogênio

líquido também pode ser usado como um combustível, como em veículos espaciais.

O estado da técnica para a geração de combustível de hidrogênio hoje em dia possui muitos desafios, como rendimento limitado, exigência de elevado aporte de energia, custos elevados, e etapas de purificação adicionais para assegurar que o combustível é suficientemente limpo. O que se necessita é um processo econômico de gerar hidrogênio em quantidades muito grandes, suficiente pra suportar o uso extensivo de células combustíveis e outros usos do hidrogênio. São particularmente desejáveis processos práticos, composições, kits, e dispositivos para converter matérias-primas renováveis, como biomassa abundante contendo polissacarídeos, diretamente em hidrogênio. Deseja-se que o processo seja capaz de altos rendimentos de H₂ e de boa eficiência de massa e energia, e, por fim, que seja de baixo custo.

Resumo da invenção

A presente invenção proporciona métodos, composições, e kits para a geração de hidrogênio a partir de biomassa. O hidrogênio assim produzido pode ser usado para qualquer número de coisas, e é bem adequado para uso como um combustível para a produção de energia. A presente invenção baseia-se, pelo menos em parte, na rede integrada de reações enzimáticas que pode converter unidade de glucano de polissacarídeos mais água a hidrogênio e dióxido de carbono:



em que (glucano) é uma unidade de anidroglicose, $-C_6H_{10}O_5-$. O hidrogênio vem de polissacarídeos e água. Em essência, a presente invenção depende da energia armazenada em polissacarídeos para quebrar a ligação da molécula de água e
5 produzir hidrogênio. Polissacarídeos podem incluir (embora sem limitação) amido, celulose, hemicelulose, maltose, isomaltose, celobiose, β -1,4-glucano, β -1,3-glucano, β -1,6-glucano, α -1,4-glucano, α -1,6-glucano, ou quaisquer outros oligômeros de unidades de açúcar monoméricas ligadas por ligações
10 glicosídicas.

Em um primeiro aspecto, a invenção proporciona um processo ou método para produzir hidrogênio a partir de um polissacarídeo. Em geral, o processo compreende: reduzir o comprimento do polissacarídeo por meio de conversão de pelo menos uma porção do
15 mesmo a glicose-6-fosfato; e gerar hidrogênio a partir de glicose-6-fosfato. O processo pode ser realizado por meio de uma quantidade de etapas químicas e enzimáticas específicas.

Por exemplo, o processo de reduzir o comprimento do polissacarídeo pode compreender fosforilar uma unidade de glucano
20 terminal do polissacarídeo, resultando em clivagem e liberação da unidade terminal do polissacarídeo de que se origina. Uma fosforilação do tipo referido pode ser realizada por meio de qualquer número de fosforilases, que podem acoplar a clivagem de uma ligação glicosídica no polissacarídeo à incorporação de um
25 grupo fosfato em uma unidade de glucano liberada para formar

glicose-6-fosfato. O processo não usa ATP ou outros compostos ligados a fosfato de alta energia.

Adicionalmente, a produção de glicose-6-fosfato pode ser realizada por qualquer via vantajosa. De preferência, a unidade
5 de glucano liberada do polissacarídeo é uma unidade de glicose-6-fosfato. No entanto, mais tipicamente, quando se usa reações enzimáticas, será uma unidade de glicose-1-fosfato, que precisa ser isomerizada a uma unidade de glicose-6-fosfato. A isomerização pode ser realizada por meio de qualquer processo
10 químico ou enzimático. Prefere-se a conversão enzimática.

A produção de hidrogênio de glicose-6-fosfato também pode ser realizada por meio de quaisquer meios químicos ou bioquímicos vantajosos. De acordo com modalidades preferidas, a glicose-6-fosfato é convertida a hidrogênio por meio de um
15 processo enzimático que envolve a conversão da glicose-6-fosfato a ribulose-5-fosfato, tipicamente por meio de 6-fosfogluconato (6PG). De acordo com uma modalidade exemplar, a conversão de 6 moles de glicose-6-fosfato a 6 moles de ribulose-5-fosfato dá 12 moles de hidrogênio molecular.

20 Compreende-se bem que reações, quer sejam químicas ou bioquímicas, apresentam equilíbrios e o produto puro tem sua formação interrompida uma vez que se tenha atingido o equilíbrio para uma reação particular. Para facilitar e maximizar a produção de hidrogênio no presente processo, ribulose-5-fosfato é removida
25 da equação de reação por meio de conversão da ribulose-5-fosfato a vários produtos. De acordo com a invenção, o(s) produto(s)

pode(m) variar amplamente, sendo que o objetivo consiste em conduzir a reação no sentido do uso da ribulose-5-fosfato para permitir a produção continuada de hidrogênio. Uma maneira vantajosa de diminuir a quantidade de ribulose-5-fosfato no sistema consiste em remover o mesmo por meio de algumas ou de todas as etapas enzimáticas da via da pentose fosfato, que é bem conhecida e amplamente compreendida na técnica.

Como deveria ser evidente, onde o processo envolve a produção enzimática de hidrogênio, o processo inclui o uso de uma hidrogenase. O hidrogênio produzido pelo processo pode ser liberado para a atmosfera, mas, de preferência, é coletado e usado imediatamente ou armazenado para uso posterior como uma fonte de combustível. Por exemplo, o processo pode compreender pelo menos a separação parcial do hidrogênio do dióxido de carbono presente no vaso de reação. Adicionalmente, parte do hidrogênio ou todo o hidrogênio pode ser introduzido em uma célula combustível para geração de eletricidade ou outra produção de energia.

Assim, em uma modalidade exemplar, o processo pode compreender: (a) proporcionar uma composição (p. ex., mistura) compreendendo pelo menos um polissacarídeo e água; (b) proporcionar uma ou mais enzimas com atividade de fosforilase; (c) fosforilar pelo menos alguns dos polissacarídeos para reduzir o comprimento de cadeia do polissacarídeo e produzir glicose-1-fosfato; (d) proporcionar uma ou mais enzimas com atividade de fosfoglucomutase; (e) isomerizar pelo menos parte

da glicose-1-fosfato produzida na etapa (c) em glicose-6-fosfato; (f) proporcionar uma pluralidade de enzimas efetivas para catalisar as etapas da via da pentose fosfato; (g) proporcionar uma ou mais enzimas com atividade de hidrogenase; e
5 (h) formar hidrogênio de pelo menos parte da glicose-6-fosfato produzida na etapa (e).

O processo da invenção, em sua forma básica geral, ou como descrito em modalidades detalhadas, pode ser realizado de qualquer maneira vantajosa.

10 Assim, todas as etapas de reação química ou bioquímica podem ser realizadas em um único vaso de reação. Alternativamente, é possível realizar separadamente uma ou mais das reações. O processo pode ser realizado como um processo de batelada ou como um processo contínuo, sendo que o hidrogênio e produtos
15 residuais são removidos continuamente, e matérias-primas novas são introduzidas.

Em modalidades, pelo menos uma das enzimas para fosforilar o polissacarídeo é uma fosforilase, como 1,4- α -glucano fosforilase, α -glucano fosforilase, amilopectina fosforilase,
20 amilofosforilase, glucano fosforilase, glucosano fosforilase, glicogênio fosforilase, maltodextrina fosforilase, maltose fosforilase, celobiose fosforilase, celodextrina fosforilase, e sacarose fosforilase. Em determinadas modalidades, pelo menos uma das enzimas para a produção de hidrogênio é uma hidrogenase
25 da arqueobactéria *Pyrococcus furiosus*.

Opcionalmente, o fosfato inorgânico pode ser adicionado ao processo numa quantidade que excede a do fosfato inorgânico gerado de outra forma no processo. Em modalidades preferidas, o fosfato não se acumula no sistema. Da mesma forma, de preferência, o ATP não é gerado ou consumido durante o processo.

Onde o processo da invenção compreende reações enzimáticas, o processo também pode ser caracterizado com referência às seguintes funcionalidades enzimáticas: (a) fosforilar pelo menos parte do polissacarídeo para produzir glicose-1-fosfato; (b) isomerizar pelo menos parte da glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato; e (c) formar hidrogênio de pelo menos parte da glicose-6-fosfato.

De maneira vantajosa, o processo pode ser conduzido em temperaturas de baixas a moderadas, como entre 10°C e 100°C. Em algumas modalidades, não se adiciona energia química externa (além do polissacarídeo), e a única energia adicionada ao sistema é calor. Ou seja, de uma forma geral, a reação global é uma reação fracamente endotérmica, e, portanto, precisa de pequenas quantidades de aporte de calor. Por exemplo, a energia de calor adicionada poderia ser obtida de células combustíveis. De preferência, o sistema é mantido a uma temperatura constante, considerando-se que a temperatura é uma função de concentrações de substrato, calores de reação puros, e perdas de calor no sistema particular. Em modalidades, o processo compreende aquecer a reação entre cerca de 10°C e cerca de 100°C.

De acordo com a presente invenção, o rendimento de hidrogênio do processo é, tipicamente, de pelo menos 10 moles de hidrogênio por mol de unidades de anidroglicose contidas no polissacarídeo de partida. Em modalidades preferidas, o rendimento do hidrogênio é de cerca de, ou pelo menos, 11, de cerca de, ou pelo menos, 11,5, de cerca de, ou pelo menos, 11,6, de cerca de, ou pelo menos, 11,7, de cerca de, ou pelo menos, 11,8, ou de cerca de, ou pelo menos, 11,9 moles de hidrogênio por mol de unidades de anidroglicose contidas no polissacarídeo de partida. Em modalidades particularmente preferidas, o rendimento de hidrogênio é de 12 moles de H₂ por mol de unidades de anidroglicose no polissacarídeo, correspondendo a 100 % do rendimento teórico.

A taxa máxima de produção de hidrogênio durante o processo da invenção não é limitada. No entanto, de preferência, ela é de pelo menos 0,1, de pelo menos 0,2, de pelo menos 0,4, de pelo menos 0,6, de pelo menos 0,8, ou de pelo menos 1,0 (ou maior) mmol/l/h.

Em um aspecto adicional, a invenção proporciona composições que são efetivas para gerar hidrogênio *in vitro* a partir de um polissacarídeo. De uma forma geral, as composições compreendem: (a) pelo menos um polissacarídeo; (b) água; (c) pelo menos uma enzima que é capaz de catalisar a conversão do(s) polissacarídeo(s) a glicose-6-fosfato, conversão de glicose-6-fosfato a 6-fosfogluconato, e conversão de 6-fosfogluconato a ribulose-5-fosfato; (d) pelo menos uma enzima que é capaz de

converter NADP^+ e glicose-6-fosfato e/ou NADP^+ e 6-fosfogluconato a NADPH e prótons; e (e) pelo menos uma enzima que é capaz de catalisar a conversão de NADPH e prótons a hidrogênio. Em modalidades preferidas, a composição também
5 compreende uma pluralidade das enzimas capazes de catalisar algumas ou todas as etapas da via da pentose fosfato.

Em determinadas modalidades, as composições incluem as seguintes enzimas (como caracterizado por meio de números EC):
(i) um enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos
10 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 2.4.1.1; (ii) uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 5.4.2.2; (iii) uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos
15 95 % idêntica ao EC 1.1.1.49; (iv) uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 1.1.1.44; (v) uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 5.3.1.6; (vi)
20 uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 5.1.3.1; (vii) uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 2.2.1.1; (viii) uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos
25 95 % idêntica ao EC 2.2.1.2; (ix) uma enzima que é pelo menos 80

%, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 5.3.1.1; (x) uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 4.1.2.13; (xi) 5 uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 3.1.3.11; (xii) uma enzima que é pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 5.3.1.9; e (xiii) uma enzima que é pelo 10 menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, mais preferivelmente, pelo menos 95 % idêntica ao EC 1.12.1.3. Em modalidades preferidas de processo e composição, não estão presentes enzimas hidrolíticas.

Em outro aspecto, a invenção proporciona kits para produzir 15 hidrogênio a partir de um ou mais polissacarídeos. De uma forma geral, um kit da invenção compreende um ou mais recipientes, cada um contendo independentemente um ou mais dentre: (a) uma ou mais enzimas capazes de fosforilar unidades de glucano de um polissacarídeo; (b) uma ou mais enzimas capazes de isomerizar 20 glicose-1-fosfato a glicose-6-fosfato; (c) uma ou mais enzimas capazes de produzir hidrogênio molecular a partir de oxidação de glicose-6-fosfato, 6-fosfogluconato, ou ambos. Em modalidades, os kits compreendem glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, ou ambas. Em modalidades, os kits 25 compreendem uma ou mais fosforilases, uma ou mais fosfoglucomutases, e uma ou mais hidrogenases. Os kits da

invenção também podem conter uma composição de enzima como descrito acima.

Os kits da invenção também proporcionam alguns ou todos os suprimentos necessários para realizar um método da invenção (i.e., produzem hidrogênio a partir de biomassa). Assim, podem conter enzimas, tampões, solventes, recipientes (p. ex., um ou mais recipientes para coletar ou usar parte ou todo o gás hidrogênio que é emitido do processo de reação e do sistema da invenção).

10 Breve descrição das figuras

Figura 1 ilustra uma via metabólica sintética para a conversão de um polissacarídeo e água a hidrogênio e dióxido de carbono de acordo com a presente invenção.

Figura 2 mostra um diagrama ilustrando um sistema para gerar e monitorar a produção de H_2 através de um processo e sistema da presente invenção.

Figura 3 mostra a taxa de produção volumétrica de hidrogênio (mmol de H_2 /l/h) de 2 mM de amido em um processo de acordo com a presente invenção.

20 Descrição detalhada de modalidades da invenção

A descrição a seguir oferece uma discussão detalhada de determinadas modalidades e particularidades dos sistemas, processos, composições, e kits da invenção. Ela não pretende ser exaustiva para todas essas modalidades e particularidades, mas, ao invés, é apresentada para proporcionar ao leitor uma melhor

compreensão de particularidades e modalidades exemplares selecionadas.

Para proporcionar ao leitor uma melhor compreensão da invenção, determinados termos são definidos e/ou discutidos
5 agora. Termos não discutidos ou definidos aqui devem ser compreendidos como sendo usados de sua maneira normal e usual na técnica.

Por "polissacarídeo" compreende-se qualquer oligômero ou polímero de unidades de glucano maiores que monômeros.
10 Polissacarídeo será usado, portanto, de forma intercambiável com "oligossacarídeo", "glucano", "oligômero de açúcar", e "polímero de açúcar". Polissacarídeos podem incluir (embora sem limitação) amido, celulose, hemicelulose, pectina, maltose, isomaltose, celobiose, β -1,4-glucano, β -1,3-glucano, β -1,6-glucano, α -1,4-
15 glucano, α -1,6-glucano, ou quaisquer outros oligômeros de unidades de açúcar monoméricas ligadas por ligações glicosídicas. Também é possível usar misturas de qualquer número de polissacarídeos, e referidas misturas são incluídas no termo "polissacarídeos".

20 Como usado aqui, "enzimas" são catalisadores de proteína que catalisam (i.e., aceleram) reações químicas e bioquímicas. Como usado aqui, "enzima" deve compreender uma enzima simples, misturas compreendendo uma ou mais enzimas, ou complexos de enzimas. Como usado aqui, "unidade de enzima" (ou "unidade") é
25 definido como uma quantidade de uma enzima que catalisa a conversão de 1 micromol (μ m) de substrato por minuto. As

condições, para fins da definição de unidade de enzima, são uma temperatura de 30° e o valor de pH e a concentração de substrato que proporcionam a taxa de conversão máxima de substrato.

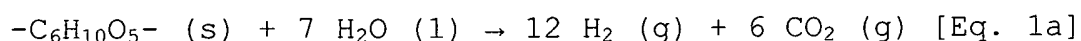
O número da Comissão de Enzimas (*EC number, Enzyme Commission number*) é um esquema de classificação numérica para enzimas, baseado nas reações químicas que elas catalisam. Para os fins da presente invenção, também se usará um número EC para especificar enzimas. Quando uma enzima é caracterizada aqui por um número EC, compreende-se que pode haver múltiplas enzimas de diferentes fontes ou organismos que, todos, catalisam a mesma reação. A invenção não é limitada a qualquer enzima ou fonte particular de enzimas, mas, ao invés, a determinadas reações catalisadas com enzima em uma via, como será descrito abaixo. A expressão "uma enzima que é caracterizada por EC 2.4.1.1", por exemplo, significa qualquer sequência de aminoácidos que possui o número EC 2.4.1.1 de acordo com pelo menos um sistema de informação de enzimas reconhecido na arte (como BRENDA ou KEGG) até a data de depósito deste pedido.

Como é de conhecimento na técnica, a "identidade" entre duas enzimas é determinada comparando-se a sequência de aminoácidos de uma enzima com a sequência de uma segunda enzima. A identidade pode ser determinada por meio de procedimentos que são bem conhecidos na arte, por exemplo, com o uso de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* no *National Center for Biological Information*). Quando a identidade da enzima é mencionada em conjunto com um número EC da enzima, de acordo com

a presente descrição deve-se compreender que pode haver muitas seqüências de aminoácidos diferentes que têm, todas, o mesmo número EC. Assim, por exemplo, a expressão "uma enzima que é pelo menos 90 % idêntica ao EC 2.4.1.1" significa uma seqüência de aminoácidos que é computada de forma a apresentar 90 % ou mais de identidade de seqüência com pelo menos uma seqüência de aminoácidos que tem o número EC 2.4.1.1 de acordo com pelo menos um sistema de informação de enzima reconhecido na arte (como BRENDA ou KEGG) até a data de depósito do presente pedido.

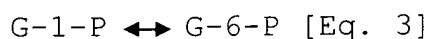
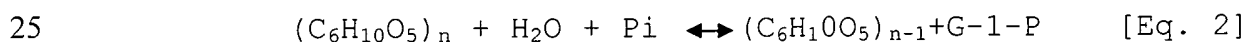
Exceto se indicado de outra forma, todos os números que expressam concentrações de componentes, condições de reação, estequiometrias, etc. usados na descrição e nas reivindicações devem ser compreendidos como sendo modificados em todos os casos pelo termo "cerca de", que indica que o valor indicado compreende todos os valores acima ou abaixo do mesmo, com variação de 5 % do valor e/ou dentro do nível de erro intrínseco ao método de obtenção do valor. Assim, exceto se indicado em contrário, os parâmetros numéricos apresentados na descrição a seguir e nas reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo, pelo menos, da técnica analítica específica. Os valores numéricos apresentados são reportados o mais precisamente possível. No entanto, qualquer valor numérico contém inerentemente determinados erros resultantes necessariamente do desvio padrão encontrado em suas respectivas medições de teste.

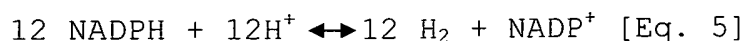
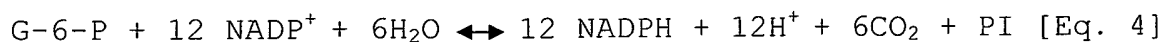
Na prática enzimática típica de determinadas modalidades dos métodos e uso de modalidades dos sistemas, composições, e kits da invenção, a presente invenção converte enzimaticamente polissacarídeos, que podem ser representados pela unidade de
 5 repetição de glucano $-C_6H_{10}O_5-$, a hidrogênio e dióxido de carbono por meio da seguinte reação global (pura):



Observe-se que 5 moles de H_2 são gerados a partir de uma unidade de repetição de glucano, enquanto que os outros 7 moles
 10 de H_2 provêm de água reagida. Os marcadores (s), (l), e (g) indicam que a espécie química encontra-se na fase sólida, líquida e gás, respectivamente. Deve-se compreender que polissacarídeos serão tipicamente suspensos, substancialmente solubilizados, ou completamente dissolvidos na fase líquida,
 15 dependendo dos polissacarídeos particulares selecionados e também da temperatura e de outras condições.

A Figura 1 mostra uma via enzimática sintética constituída de 13 reações enzimáticas reversíveis: a) uma reação de fosforilação de encurtamento de cadeia catalisada por
 20 fosforilase dando glicose-1-fosfato (Eq. 2); b) a conversão de glicose-1-fosfato (G-1-P) a glicose-6-fosfato (G-6-P) catalisada por fosfoglucomutase (Eq. 3); c) uma via de pentoses-fosfato contendo 10 enzimas (Eq. 4); e d) geração de hidrogênio a partir de NADPH catalisada por hidrogenase (Eq. 5).

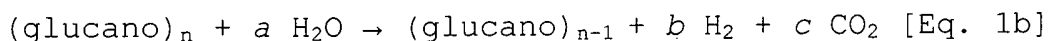




Em modalidades, a via enzimática da invenção compreende três blocos principais: (a)(1) fosforilação de encurtamento de
 5 cadeia de polissacarídeo catalisada por fosforilases, seguido de (a)(2) conversão de glicose-1-fosfato a glicose-6-fosfato catalisada por fosfoglucomutase; (b) a via de pentoses-fosfato, compreendendo uma fase oxidativa, que converte G-6-P a ribulose-5-P, CO_2 , e NADHP; e uma fase não-oxidativa, que pode regenerar
 10 ribulose-5-P a G-6-P; e (c) geração de hidrogênio a partir de NADPH catalisada por hidrogenase.

A combinação de encurtamento de cadeia por glucano fosforilase e a conversão de G-1-P a G-6-P permite o uso da energia armazenada em ligações glicosídicas de polissacarídeos.
 15 Em contraste, a hidrólise convencional de ligações glicosídicas de polissacarídeos dissipa referida energia. Como os produtos de reação gasosos (H_2 e CO_2) podem ser removidos da solução líquida simultaneamente, a reação pode ser conduzida efetivamente no sentido da produção de hidrogênio, enquanto que as cadeias de
 20 polissacarídeo são encurtadas simultaneamente em vias de reação concorrentes.

De uma maneira geral, a reação global pode ser escrita como



em que o coeficiente b define o rendimento de hidrogênio
 25 obtido do polissacarídeo de partida. Termodinamicamente, a reação representada pela Eq. 1 é um processo espontâneo ($\Delta G^\circ = -48,9$

kJ/mol) e é uma reação endotérmica ($\Delta H^\circ = 595,6$ kJ/mol) (Atkins e De Paula, 2005). Quando os produtos gasosos (H_2 e CO_2) são removidos continuamente da solução de reação líquida, a reação pura (Eq. 1) torna-se favorável (no sentido à frente) de acordo com o princípio de Le Chatelier. Portanto, é preferível remover pelo menos um dos produtos gasosos à medida que são formados; sendo que é particularmente preferível remover ambos os produtos (H_2 e CO_2) na mesma taxa em que são formados, para evitar acúmulo e favorecer a conversão completa do polissacarídeo.

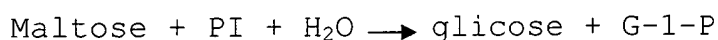
Mais água consumida ($a > 7$ na Eq. 1b) não gerará mais hidrogênio, mas, ao invés, tenderá a causar hidrólise tradicional do glucano, produzindo cadeias mais curtas juntamente com a dissipação de energia na solução. A fosforilação de substrato de encurtamento de cadeia de polissacarídeo (Eq. 2) usa a energia armazenada nas ligações glicosídicas de polissacarídeos (15,5 kJ/mol de ligação glicosídica) para produzir o monossacarídeo fosforilado ativado (G-1-P) sem consumo de ATP. Essencialmente, a energia que é armazenada em polissacarídeos é canalizada para moléculas de água para quebrá-las e liberar a energia em forma de hidrogênio.

A hidrólise do polissacarídeo pode ser minimizada mesmo com presença de um excesso de água, por meio do uso de uma solução que é substancialmente isenta de enzimas hidrolíticas (p. ex., amilases para amido ou celulasas para celulose). Portanto, em modalidades preferidas da invenção, a solução líquida não contém uma quantidade significativa de enzimas hidrolíticas ativas.

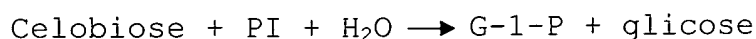
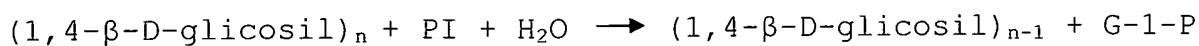
Quaisquer ligações glicosídicas entre duas unidades de glicosídeo contêm energia de ligação química. A hidrólise simples de ligações glicosídicas para polissacarídeos e oligossacarídeos dissipa a energia de ligação de ligações glicosídicas. Na natureza, fosforilases podem conservar a energia por meio de fosforilação de substrato.

Fosforilases são enzimas alostéricas que catalisam a produção de glicose-1-fosfato. De uma forma mais geral, fosforilases são enzimas que catalisam a adição de um grupo fosfato a partir de um fosfato inorgânico a um receptor. Fosforilases incluem EC 2.4.1.1 (1,4- α -glucano fosforilase, α -glucano fosforilase, amilopectina fosforilase, amilofosforilase, glucano fosforilase, glucosan fosforilase, glicogênio fosforilase, maltodextrina fosforilase); EC 2.4.1.8 (maltose fosforilase); EC 2.4.1.20 (celobiose fosforilase); EC 2.4.1.49 (celodextrina fosforilase); e EC 2.4.1.7 (sacarose fosforilase). Fosforilases efetivas também podem ser selecionadas dentre enzimas com pelo menos 80 % de identidade, de preferência, pelo menos 90 % de identidade, com as enzimas indicadas neste parágrafo.

Para substratos contendo ligações α -1,4-glicosídicas, como amido, as reações de fosforilação são como a seguir:



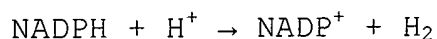
Para substratos contendo ligações β -1,4-glucosídicas, como celulose, as reações de fosforilação são como a seguir:



Após uma série de reações de fosforólise mediadas por fosforilases, é possível produzir uma grande quantidade de G-1-P de forma reversível. A remoção de G-1-P levará a reações de encurtamento de cadeia.

Fosfoglucomutases são enzimas que criam um isômero de glicose por meio de alteração do sítio do íon fosfato, convertendo entre G-1-P e G-6-P. Um exemplo de uma fosfoglucomutase é a enzima caracterizada por EC 5.4.2.2, ou uma enzima com pelo menos 80 % de identidade, de preferência, pelo menos 90 % de identidade, com uma enzima do tipo referido.

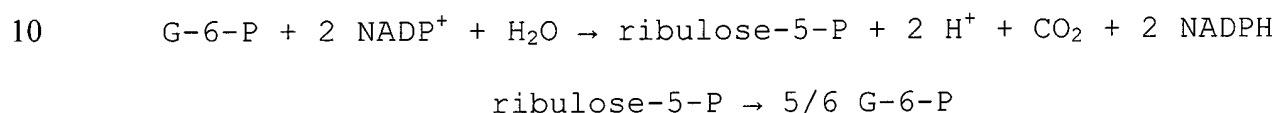
Hidrogenases são enzimas que catalisam a oxidação reversível de hidrogênio molecular (H_2). Hidrogenases desempenham um papel vital no metabolismo anaeróbico. A absorção de hidrogênio (oxidação de H_2) é acoplada com a redução de receptores de elétrons, como oxigênio, nitrato, sulfato, dióxido de carbono, e fumarato, enquanto que a redução de próton (evolução de H_2) é essencial na fermentação de piruvato e na eliminação do excesso de elétrons. A hidrogenase pode produzir gás hidrogênio a partir de NADPH de acordo com a seguinte reação:



Um exemplo de uma hidrogenase é a enzima caracterizada por EC 1.12.1.3, ou uma enzima com pelo menos 80 % de identidade, de preferência, pelo menos 90 % de identidade, com uma enzima do tipo referido. Algumas modalidades da invenção empregam uma

hidrogenase isolada de uma arqueobactéria de *Pyrococcus furiosus* hiper-termofílica (Bryant e Adams, 1989; Ma e Adams, 1994; Ma et al, 1994; Pedroni et al, 1995; Ma et al, 2000). Embora a reação de redução de NADPH não ocorra espontaneamente, a hidrogenase especial de *Pyrococcus furiosus* 1 pode catalisar a redução de NADPH para gerar hidrogênio *in vitro*.

A via de pentose-fosfato consiste de uma fase oxidativa, que converte G-6-P a ribulose-5-P, e uma fase não-oxidativa, que regenera G-6-P a partir de ribulose-6-P:



De uma forma geral, a seleção de uma pluralidade de enzimas que ativam a via de pentose-fosfato está dentro da capacidade de um pessoa com prática ordinária na arte. Uma modalidade particular é discutida no Exemplo 1 (ver Tabela 1). Outras modalidades usam enzimas similares, enzimas com pelo menos 80 %, de preferência, pelo menos 90 %, de identidade de sequência com as enzimas da via de pentose-fosfato listadas na Tabela 1 (números EC 1.1.1.49, 1.1.1.44, 5.3.1.6, 5.1.3.1, 2.2.1.1, 2.2.1.2, 5.3.1.1, 4.1.2.13, 3.1.3.11, e 5.3.1.9).

Em algumas modalidades, enzimas são adicionadas diretamente na solução aquosa de polissacarídeos. A quantidade de enzimas a ser adicionada depende da temperatura de reação desejada e do tempo de residência. De uma forma geral, haverá concentração de cada enzima particular acima da qual não ocorre incremento

adicional da taxa de reação. A quantidade ótima de enzima será determinada por vários fatores econômicos.

As enzimas podem ser purificadas (embora não necessariamente purificadas), e elas podem existir em forma de misturas de enzimas ou complexos de enzimas com as funções desejadas. Enzimas podem ser adicionadas em forma de células lisadas que produziram as enzimas em um processo de fermentação precedente. Neste caso, também seria possível adicionar fragmentos de células no reator.

Em algumas modalidades, fosfato inorgânico (Pi) e coenzima (NADPH) são reciclados continuamente no sistema. Ou seja, estas substâncias são produzidas e consumidas em taxas iguais. É possível adicionar uma pequena quantidade de fosfato inorgânico, se necessário, no início do processo para iniciar a fosforilação. Também, se necessário (em virtude de reações secundárias ou de outras razões), é possível adicionar mais Pi e/ou NADPH em qualquer ponto dentro do processo.

O pH da solução não é considerado particularmente crítico, mas o pH impactará a atividade de cada enzima de uma maneira potencialmente diferente. Da mesma forma, observa-se que a reação que gera H_2 na via da invenção consome prótons, sendo que sua concentração é controlada através do pH da solução. Uma pessoa com prática ordinária na técnica poderá realizar facilmente experimentação de rotina, dada uma seleção específica de enzimas, para determinar o pH ótimo do sistema, ou para determinar uma faixa de valores de pH preferidos, com relação ao

rendimento de H_2 ou à taxa de produção. Em outras palavras, o processo da invenção pode compreender ajustar um ou mais parâmetros durante a reação para manter um parâmetro ou otimizar um parâmetro. Uma faixa ilustrativa de valores de pH preferidos para algumas modalidades é pH = de 2 a 12, mais preferivelmente 5 de 4 a 9, e, da forma mais preferível, um pH neutro, como pH de 6 a 8.

A temperatura não é considerada crítica para a presente invenção. Temperaturas de baixas a moderadas são apropriadas, 10 particularmente quando se seleciona enzimas mesofílicas. O processo pode ser praticado de uma maneira geral a uma ou mais temperaturas de cerca de $10^{\circ}C$ a cerca de $100^{\circ}C$, de preferência, de cerca de $25^{\circ}C$ a cerca de $75^{\circ}C$. Cada uma das enzimas selecionadas terá suas próprias funções respectivas de atividade 15 versus temperatura, e a temperatura ótima global será uma função das enzimas específicas selecionadas. Alguém com prática na técnica perceberá que é possível usar temperaturas fora da faixa de $10^{\circ}C$ a $100^{\circ}C$, como quando se seleciona enzimas termofílicas ou psicrofílicas. Em algumas modalidades não se adiciona energia 20 externa, e a temperatura será uma função das concentrações de substrato, calores puros de reações, e perdas de calor no sistema.

A pressão também não é crítica para a presente invenção, mas uma pessoa versada na técnica perceberá que a pressão de reação 25 pode impactar sobre a distribuição de equilíbrio de espécies. Uma pressão elevada, como de várias atmosferas, poderia tender a

inibir a evolução do gás-produto. Inversamente, uma baixa pressão do sistema tenderá a empurrar o equilíbrio no sentido de produtos (hidrogênio e dióxido de carbono). Para maior facilidade, as reações são conduzidas, de preferência, a pressão atmosférica. O processo poderia ser conduzido sob um vácuo. Da mesma forma, o processo poderia ser realizado na presença de gases diferentes daqueles produzidos ou consumidos, como ar, nitrogênio, hélio, argônio, e análogos.

O processo pode ser conduzido em um reator de batelada, um reator contínuo, ou alguma combinação dos dois. É possível usar uma variedade de meios para agitação (mistura), ou um reator de *plug-flow* sem mistura interna pode ser efetivo. Reagentes não-cobertos (polissacarídeos) podem ser reciclados para a entrada do reator, como é de conhecimento geral na técnica.

Com relação à Eq. 1b $[(\text{glucano})_n + a \text{ H}_2\text{O} \rightarrow (\text{glucano})_{n-1} + b \text{ H}_2 + c \text{ CO}_2]$, uma pessoa com prática ordinária na técnica compreenderá que o processo pode ser otimizado, sem experimentação desnecessária, de tal forma que, numa base global, o coeficiente a pode ser de cerca de 7, b pode ser de cerca de 12, e c pode ser de cerca de 6. Em algumas modalidades, ocorrem algumas reações secundárias, reduzindo o rendimento de H_2 . Em outras modalidades, a seletividade do átomo de hidrogênio por H_2 é muito elevada (pelo menos de cerca de 90 %), mas o polissacarídeo não é completamente convertido a produtos, resultando em rendimentos menores. Por vezes, aspectos econômicos

determinam um processo mantendo-o num nível inferior ao do seu maior rendimento obtenível.

A otimização também pode ser realizada de forma a melhorar a taxa de reação global e a estabilidade de algumas ou de todas as enzimas. Referida otimização pode incluir, por exemplo, a
5 otimização do componente de enzima via modelagem e manipulação metabólica; substituição de enzimas mesofílicas por meio de enzimas termofílicas recombinantes ou mesmo de enzimas hipertermofílicas; manipulação de enzimas para melhorar a
10 atividade e/ou a seletividade de enzima; concentrações maiores de enzimas e substratos; variação dos parâmetros de processo, como pH e temperatura; estabilização de enzimas por meio de aditivos; imobilização de enzima; e desenvolvimento de microorganismos mínimos para criar um sistema de enzima *in vivo*
15 que produz H₂. Encontra-se dentro da capacidade de uma pessoa com prática ordinária na técnica das enzimas como conduzir referida otimização, e a presente invenção deve incluir este tipo de experimentação. É possível usar desenho experimental estatístico para explorar superfícies de resposta global e estabelecer
20 modelos de rendimento de H₂ e de taxa versus fatores de enzima e processo e também efeitos de interação.

Como mencionado acima, um aspecto da invenção compreende um kit para realizar os métodos da invenção. De uma forma geral, os kits são kits para gerar e coletar gás hidrogênio. Os kits da
25 invenção compreendem alguns ou todos os componentes necessários para praticar uma ou mais modalidades dos métodos da invenção.

Assim, um kit da invenção pode compreender um ou mais dentre:

- (a) uma ou mais enzimas com alguma atividade de fosforilase; (b) uma ou mais enzimas com alguma atividade de fosfoglucomutase; (c) uma ou mais enzimas com alguma atividade de hidrogenase; (d)

5 um recipiente para combinar um polissacarídeo, água, e as enzimas dos elementos (a), (b), e (c); (e) meios para aquecer o recipiente a uma temperatura entre cerca de 10 a 100°C; e (f) meios para coletar ou usar parte do gás hidrogênio que é emitido do recipiente. Os kits da invenção também podem conter uma
10 composição de enzima como descrito acima.

As enzimas, reagentes, e aditivos (se desejado) e outros componentes podem ser fornecidos em um ou mais recipientes adequados dentro do kit. O kit pode compreender componentes suficientes para realizar o método da invenção uma única vez ou
15 várias vezes. Kits podem ser fabricados de qualquer material vantajoso, como plástico, vidro, e metal.

O hidrogênio tem uma quantidade de usos possíveis. O hidrogênio molecular é usado para a produção de amônia; no refino de petróleo, em que H_2 é usado em toda uma refinaria
20 típica; nas indústrias de síntese química, quando se deseja a conversão de uma dupla ligação carbono-carbono a uma ligação simples C-C, ou de uma tripla ligação carbono-carbono a uma ligação simples ou dupla ligação; na indústria de alimentos para a hidrogenação de óleos vegetais; e na fabricação de circuitos
25 eletrônicos. O hidrogênio também é usado extensivamente hoje em dia para preparar metanol, fertilizantes, vidro, metais

refinados, vitaminas, cosméticos, sabões, lubrificantes, e limpadores. Adicionalmente, o hidrogênio puro é um combustível excelente, tanto em motores de combustão tradicionais como também em células combustíveis, e produz apenas vapor d'água quando oxidado com oxigênio. Também é possível usar hidrogênio líquido como um combustível, como em veículos espaciais.

O hidrogênio produzido pelo processo da presente invenção pode ser separado de outras substâncias (p. ex., dióxido de carbono) completamente ou parcialmente, ou ele pode ser usado em conjunto com a(s) outra(s) substância(s). Quando se deseja separar pelo menos parte do CO_2 do H_2 é possível usar uma variedade de técnicas de separação conhecidas. Uma técnica do tipo referido utiliza a separação por meio de peneiras moleculares. Também seria possível separar CO_2 de H_2 usando destilação criogênica, por exemplo.

Um exemplo do uso direto de misturas de H_2/CO_2 é a produção de acetato a partir de H_2 e CO_2 usando *Clostridium aceticum*, como é de conhecimento na arte. Outros meios de converter misturas de H_2/CO_2 com diversas concentrações, por via bioquímica ou química, também são conhecidos.

Exemplo

Agora a presente invenção será caracterizada e descrita adicionalmente com referência ao seguinte exemplo não-limitante, que deve ser considerado puramente exemplar para a invenção, e não deve se compreender como limitando a invenção de qualquer forma. Em resumo, os parágrafos a seguir descreverão seleções

ilustrativas de enzimas e procedimentos experimentais que demonstram uma modalidade da invenção.

Exemplo 1: Produção enzimática de H_2 e CO_2 a partir de amido e água

5 Para exemplificar a natureza prática dos presentes métodos, sistemas, e composições, amido foi convertido a hidrogênio e dióxido de carbono em um processo de acordo com a presente invenção. Realizou-se experimentos em um sistema de fluxo contínuo com os retentor de umidade resfriadas com gelo. Todos
10 os químicos e enzimas foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (E.U.A.), exceto se indicado de outra forma. Todas as enzimas e suas reações de catálise encontram-se listadas na Tabela 1. O volume de trabalho do reator personalizado foi de 2 ml. O sistema foi purgado continuamente com hélio a uma taxa de fluxo
15 de 50 ml/min. A temperatura do vaso de reação encamisado foi mantida a $30^{\circ}C$ com um banho de água circulante Polyscience (Niles, IL).

Tabela 1: Enzimas e reações de catálise

EC	Nome da enzima	Reação	Origem	Unid ades
2.4.1.1	glicogênio fosforilase	$(C_6H_{10}O_5)_n + P_1 + H_2O \rightarrow$ $(C_6H_{10}O_5)_{n-1} + \text{glicose-}$ 1-P	músculo de coelho	10
5.4.2.2	fosfoglucomutase	$G-1-P \rightarrow G-6-P$	músculo de coelho	10

1.1.1.49	glicose-6- fosfato desidrogenase	$G-6-P + NADP^+ \rightarrow 6-$ fosfogluconato + NADPH	<i>S.cerevisiae</i>	1
1.1.1.44	desidrogenase 6- fosfogluconica	6-fosfogluconato + $H_2O + NADP^+ \rightarrow$ ribulose-5-fosfato + NADPH + CO_2	<i>S.cerevisiae</i>	1
5.3.1.6	ribose 5- fosfato isomerase	ribulose-5-fosfato $\rightarrow$ ribose-5-fosfato	espinafre	1
5.1.3.1	ribulose-5- fosfato 3- epimerase	ribulose-5-fosfato $\rightarrow$ xilulose-5-fosfato	<i>S.cerevisiae</i>	1
2.2.1.1	transcetolase	xilulose-5-fosfato + ribose-5-fosfato $\rightarrow$ sedoheptulose-7- fosfato + gliceraldeído-3- fosfato	<i>E.coli</i>	1
2.2.1.2	transaldolase	sedoheptulose-7- fosfato + gliceraldeído-3- fosfato $\rightarrow$ frutose-6- fosfato + eritrose-4- fosfato	<i>S.cerevisiae</i>	1

5.3.1.1	triose-fosfato isomerase	gliceraldeído 3- fosfato → diidroxiacetona fosfato	músculo de coelho	1
4.1.2.13	aldolase	gliceraldeído 3- fosfato diidroxiacetona fosfato → Fructose-1,6- bifosfato	músculo de coelho	1
3.1.3.11	frutose-1,6- bifosfato	frutose-1,6-bifosfato $H_2O \rightarrow$ frutose-6- fosfato + Pi	<i>E.coli</i>	1
5.3.1.9	fosfoglicose isomerase	frutose-6-fosfato → glicose-6-P	<i>S.cerevisiae</i>	1
1.12.1.3	hidrogenase I de <i>P.furiosus</i>	$NADPH + H^+ \rightarrow NADP^+ +$ H_2	<i>P.furiosus</i>	~70

A Figura 2 mostra um diagrama que ilustra o sistema de célula de hidrogênio da invenção configurado para monitorar H_2 com um sensor baseado no Figaro TGS 822 e O_2 com uma célula galvânica Hersh modificada. O analisador de CO_2 (não mostrado)

5 foi ligado entre a célula de reação e a célula de eletrólise. Oxigênio e também hidrogênio e dióxido de carbono foram monitorados no fluxo de gás. A evolução de hidrogênio foi medida com um sensor de óxido de estanho Figaro TGS 822 conectado por meio de um amplificador de ponte a um multímetro Keithley Modelo

2000 (Keithley Instruments, Cleveland, OH). A concentração de oxigênio foi monitorada com uma célula galvânica Hersh modificada usando 24 % de KOH como o eletrólito conectado a um picoamperímetro auto-calibrante [autoranging] Keithley. A produção de dióxido de carbono foi medida com um analisador de CO₂ LI-COR modelo LI-6252 conectado a um multímetro Keithley 2000. Os multímetros e o picoamperímetro foram conectados a um computador através de placas de interface de uso geral IEEE 488. A eletrólise para calibração de hidrogênio e oxigênio de acordo com a lei de Faraday da equivalência eletroquímica foi realizada com uma fonte de corrente programável Keithley 220 conectada a uma célula de eletrólise em-linha. A calibração relativa ao dióxido de carbono foi realizada com uma mistura de gás analisada consistindo de 735 ppm de dióxido de carbono e 1000 ppm de oxigênio em hélio (Air Liquide America Corp., Houston, TX).

A coleta e análise de dados foi realizada com o programa ASYST 4.0 (ASYST Technologies, Inc., Rochester, NY). Os rendimentos molar/molar integrados de hidrogênio (Y_{H_2}) e dióxido de carbono (F_{CO_2}) foram calculados como

20

$$Y_{H_2} = \frac{\int r_{H_2} dt}{12 * \Delta GE}$$

$$Y_{CO_2} = \frac{\int r_{CO_2} dt}{6 * \Delta GE}$$

em que r_{H_2} e r_{CO_2} são as taxas de produção volumétrica em mmoles de H₂ ou CO₂ por litro de volume de reação, por hora, e ΔGE é o consumo líquido de equivalentes de glicose em mM.

25

G-6-P residual pode ser medido usando o kit de glicose HG da Sigma. As misturas foram incubadas a 35°C durante 5 minutos e determinou-se a absorbância a 340 nm. O amido residual, G-1-P, e G-6-P foram hidrolisados a glicose por meio de adição de H₂SO₄ diluído e hidrólise a 121°C durante 1 hora. As soluções de glicose neutralizadas foram medidas com um kit de glicose HK.

A solução continha 1 unidade de cada uma das enzimas do ciclo de pentose fosfato, aproximadamente 70 unidades de hidrogenase de *P. furiosus*, 10 unidades de α -glucano fosforilase, 10 unidades de fosfoglucomutase, 4 mM de fosfato, 0,5 mM de pirofosfato de tiamina, 2 mM de NADP⁺, 10 mM de MgCl₂, e 0,5 mM de MnCl₂ em 2,0 ml de 0,1 M de tampão HEPES (pH 7,5). O experimento foi conduzido a cerca de 30°C.

A Figura 3 mostra a taxa de produção volumétrica de hidrogênio (mmol de H₂/l/h) de 2 mM de amido. Os rendimentos integrados (mol/mol) de hidrogênio e CO₂ foram de 5,19 H₂/unidade de glucano e de 5,37 CO₂/unidade de glucano, respectivamente. Os rendimentos de hidrogênio e de CO₂ a partir de amido foram de aproximadamente 43 % e 86 % dos rendimentos teóricos. Acredita-se que o rendimento reduzido de hidrogênio deveu-se primariamente à conversão incompleta e, possivelmente, ao acúmulo de metabólitos, como NADPH.

Embora se tenha descrito aqui de forma detalhada modalidades ilustrativas e várias modificações das mesmas, alguém com prática na técnica perceberá que o presente pedido não precisa limitar-se a estas modalidades precisas e às modificações

descritas, e que é possível praticar diversas alterações e modificações adicionais sem afastar-se do escopo ou espírito da invenção como definida nas reivindicações anexas. Aqueles com prática na técnica perceberão outras modalidades, incluindo 5 modalidades que não proporcionam todas as características e vantagens apresentadas aqui.

Referências

- Alper J., *Science* 2003, 299:1686-1687.
- Atkins P.W., *Physical Chemistry* (quarta edição). New York: 10 W.H. Freeman & Co.; 1990.
- Atkins P.W. e De Paula J. *Elements of Physical Chemistry* (4ª edição). New York: W.H. Freeman & Co. (2005), 605-613.
- Benemann *et al*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70:2317, 1973.
- Berg J. M. *et al.*, *Biochemistry* (quinta edição), New York: 15 W. H. Freeman & Co.; 2002.
- Bryant F.O. e Adams M.W.W, *J. Biol. Chem.* 1989, 264:5070-5079.
- Cortright R.D. *et al.*, *Nature* 2002, 418:964-967.
- Deluga G.A. *et al.*, *Science* 2004, 303:993-997.
- 20 Farrell A.E. *et al.*, *Science* 2006, 311 :506-508.
- Hoffert M.I. *et al.*, *Science* 2002, 298:981-987.
- Huber G.W. *et al.*, *Science* 2003, 300:2075-2077.
- Klein e Betz, *Plant Physiol.* 61 :953, 1978.
- Lynd L.R. *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002, 66:506- 25 577.
- Lynd L.R. *et al*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005, 16:577-583.

Lynd L.R. *et al.*, em *Cellulosome*. Editado por Kataeva IA: Nova Science Publishers, Inc.; 2006.

Ma K. e Adams M.W., *J. Bacteriol.* 1994, 176:6509-6517.

Ma K. *et al*, *FEMS Microbiol. Lett.* 1994, 122:245-250.

5 Ma K. *et al*, *J. Bacteriol.* 2000, 182:1864-1871.

Markov *et al.*, *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 52:60, 1995.

Morris D., *J. Sci. Food Agric.* 86:1743-1746 (2006).

Muir M. *et al*, *J. Bacteriol.* 1985, 163:1237-1242.

10 Nelson D.L. e Cox M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry* (terceira edição). New York: Worth Publishers; 2000.

Pedroni P. *et al*, *Microbiol.* 1995, 141 :449-458.

Rao *et al.*, *Biochimie* 60:291, 1978.

15 Rosen e Krasna, *Photochem. Fotobiol.* 31 :259, 1980.

United States Department of Energy: "Basic Research Needs for the Hydrogen Economy" (2004) publicado em <http://www.sc.doe.gov/bes/hydrogen.pdf>.

20 Vatsala e Seshadri, *Proc. Indian Nat'l Sci. Acad.* B51 :282, 1985.

Woodward J. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 1996, 14:872-874.

Woodward J. *et al.*, *Nature* 2000, 405:1014-1015.

Woodward J. *et al.*, *Energy Fuels* 2000, 14: 197-201.

25 Zhang Y.-H.P. e Lynd L.R., *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70:1563-1569.

Zhang Y.-H.P. e Lynd L.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005,
102:7321-7325.

Zhang Y.-H.P. e Lynd L.R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
2006, 70:123-129.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo *in vitro*, isento de células, para produzir hidrogênio a partir de um polissacarídeo, caracterizado pelo fato de o referido processo compreender:

5 reduzir o número de unidades de glucano do polissacarídeo mediante conversão de pelo menos uma unidade de glucano a ribulose-5-fosfato; e

 gerar hidrogênio a partir da conversão da unidade de glucano a ribulose-5-fosfato.

10 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a conversão de pelo menos uma unidade de glucano a ribulose-5-fosfato compreender:

 converter enzimaticamente a unidade de glucano a glicose-1-fosfato;

15 converter enzimaticamente a glicose-1-fosfato a glicose-6-fosfato;

 converter enzimaticamente a glicose-6-fosfato a 6-fosfogluconato; e

20 converter enzimaticamente a 6-fosfogluconato a ribulose-5-fosfato.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de a produção de hidrogênio ser acoplada enzimaticamente à conversão de glicose-6-fosfato a ribulose-5-fosfato.

4. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente converter enzimaticamente a ribulose-5-fosfato a um ou mais produtos de reação.

5 5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do hidrogênio ser produzido por uma hidrogenase.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de todas as etapas serem realizadas em um único vaso de reação.

10 7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do polissacarídeo compreender amido.

8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do polissacarídeo compreender celulose.

9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do polissacarídeo compreender hemicelulose.

15 10. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do polissacarídeo não ser amido ou celulose.

20 11. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente separar, pelo menos parcialmente, o hidrogênio do dióxido de carbono produzido pelo processo.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente introduzir pelo menos parte do hidrogênio em uma célula combustível.

25 13. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente gerar eletricidade a partir do hidrogênio.

14. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do rendimento de hidrogênio ser de pelo menos 10 moles de hidrogênio por mol de unidades de anidroglicose contidas no polissacarídeo de partida.

5 **15.** Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a taxa máxima de produção de hidrogênio é de pelo menos 0,4 mmol/l/h.

16. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do processo compreender:

10 (a) proporcionar uma mistura compreendendo um polissacarídeo e água;

(b) proporcionar uma ou mais enzimas com atividade de fosforilase;

15 (c) fosforilar pelo menos parte do polissacarídeo para produzir glicose-1-fosfato e um polissacarídeo encurtado;

(d) proporcionar uma ou mais enzimas com atividade de fosfoglucomutase;

(e) isomerizar pelo menos parte da glicose-1-fosfato produzida na etapa (c) a glicose-6-fosfato;

20 (f) proporcionar uma pluralidade de enzimas efetivas para catalisar as etapas da via de pentose fosfato;

(g) proporcionar uma ou mais enzimas com alguma atividade de hidrogenase; e

25 (h) formar hidrogênio a partir de pelo menos parte da glicose-6-fosfato produzida na etapa (e).

17. Composição efetiva para gerar hidrogênio *in vitro* a partir de um polissacarídeo, caracterizado pelo fato da referida composição compreender:

(a) um polissacarídeo;

5 (b) água;

(c) uma enzima ou enzimas capazes de catalisar a conversão do polissacarídeo a glicose-6-fosfato;

(d) uma enzima ou enzimas capazes de catalisar a conversão de NADPH e prótons a hidrogênio; e

10 (e) uma pluralidade de enzimas capazes de catalisar as etapas da via de pentose fosfato.

18. Kit para produzir hidrogênio a partir de um polissacarídeo, caracterizado pelo fato do kit compreender:

(a) uma ou mais enzimas com atividade de fosforilase;

15 (b) uma ou mais enzimas com atividade de fosfoglucomutase;

(c) uma ou mais enzimas com atividade de hidrogenase;

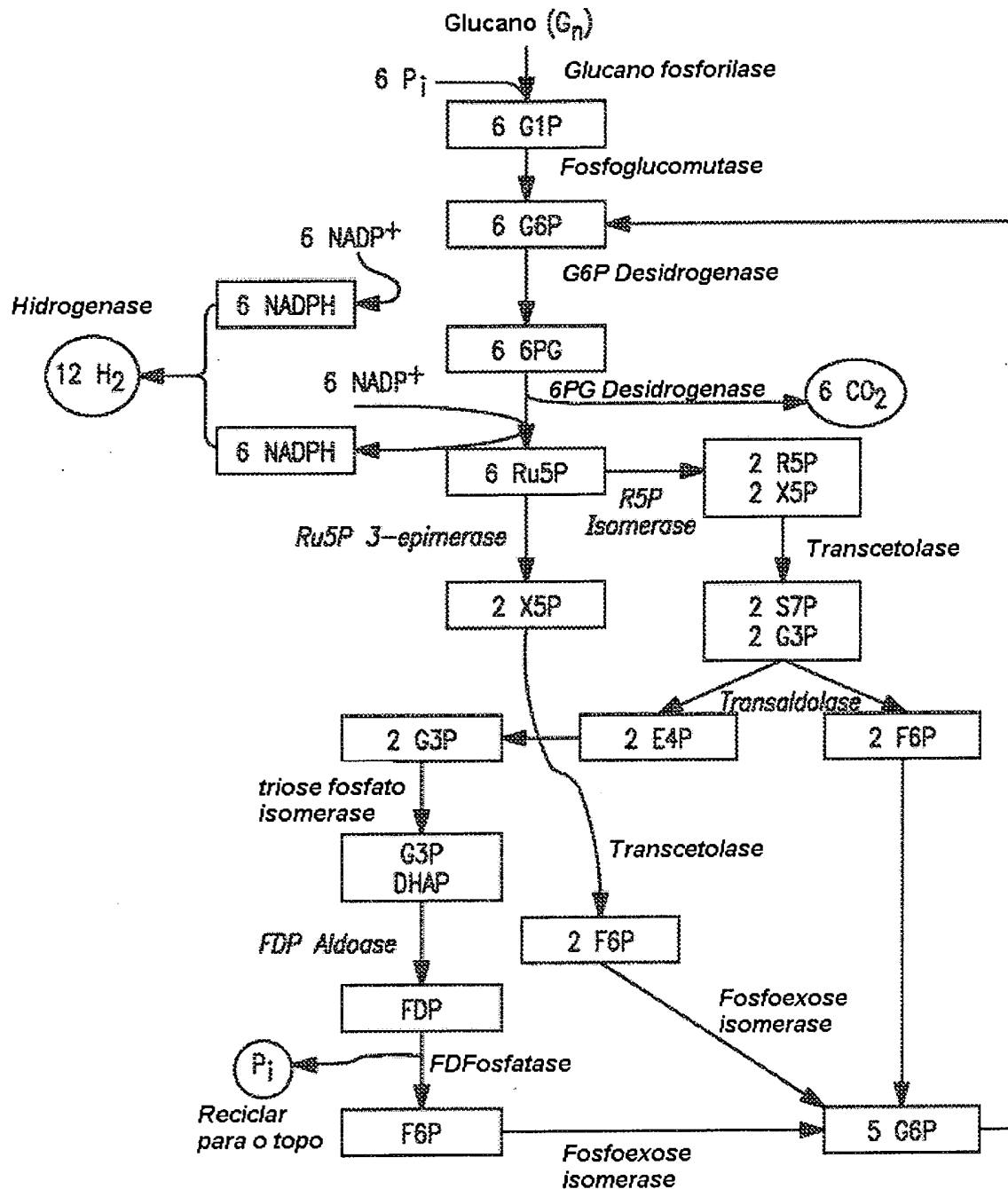
(d) um recipiente para combinar um polissacarídeo, água, e as enzimas dos elementos (a), (b), e (c);

(e) meios para aquecer o recipiente entre 10°C e 100°C; e

20 (f) meios para coletar ou usar parte ou todo o gás hidrogênio que surge do recipiente.

19. Kit de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato do rendimento de hidrogênio ser de pelo menos 10 moles de hidrogênio por mol de unidades de anidroglicose contidas no
25 polissacarídeo de partida.

20. Kit de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente meios para gerar eletricidade a partir de gás hidrogênio.



G1P = glicose-1-fosfato
 G6P = glicose-6-fosfato
 6PG = 6-fosfogluconato
 Ru5P = ribulose-5-fosfato
 R5P = ribose-5-fosfato
 X5P = xilulose-5-fosfato
 S7P = sedoheptulose-6-fosfato

G3P = gliceraldeido-3-fosfato
 E4P = eritrose-4-fosfato
 F6P = frutose-6-fosfato
 DHAP = diidroxiacetona fosfato
 FDP = frutose difosfato
 P_i = fosfato inorgânico

Figura 1

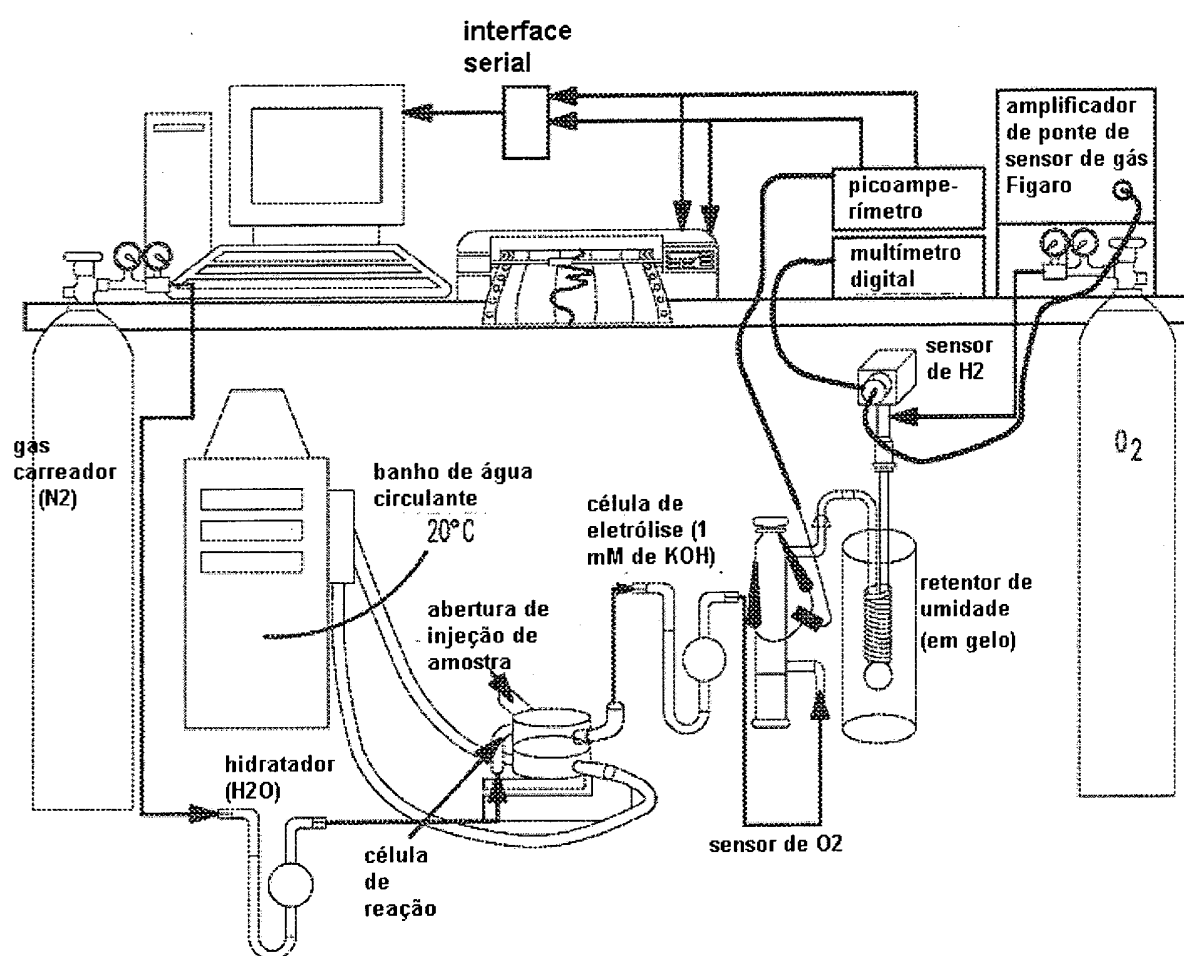


Figura 2

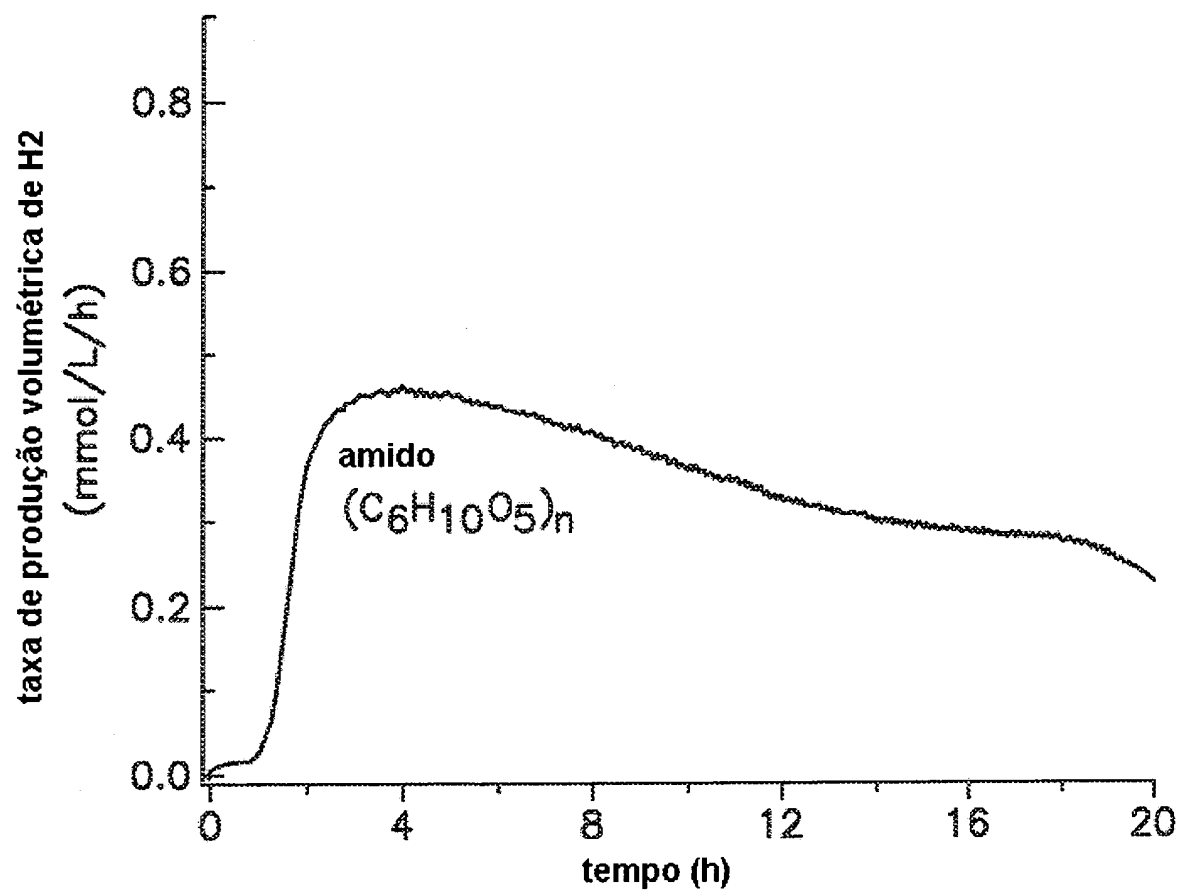


Figura 3

RESUMO

Pedido de Patente de Invenção para: "PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO POR VIA ENZIMÁTICA ARTIFICIAL".

A presente invenção compreende um processo enzimático *in vitro* que converte efetivamente polissacarídeos renováveis em altos rendimentos de hidrogênio em condições brandas, usando apenas enzimas e água. O processo compreende uma quantidade de enzimas (1) fosforilases, (2) fosfoglucomutases, (3) hidrogenases, e (4) enzimas envolvidas na via de pentose-10 fosfato. Modalidades preferidas do processo produzem apenas hidrogênio e dióxido de carbono como produtos puros, traduzindo-se em um método econômico de gerar hidrogênio em quantidades muito grandes a partir de matérias-primas de baixo custo.