



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0919304-9 A2



(22) Data do Depósito: 30/09/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

(54) **Título:** PROCESSO DE FERMENTAÇÃO COMEÇANDO A PARTIR DE BIOMASSA CELULÓSICA E ENVOLVENDO A RECIRCULAÇÃO DE VINHAÇA DESINTOXICADA NO PROCESSO.

(51) **Int. Cl.:** C12P 7/10.

(30) **Prioridade Unionista:** 30/09/2008 EP 08 165507.8.

(71) **Depositante(es):** SEKAB E-TECHNOLOGY AB.

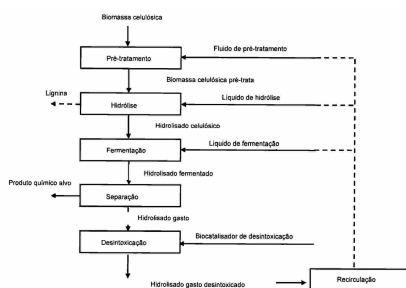
(72) **Inventor(es):** LEIF JÖNSSON; BJÖRN ALRIKSSON.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2009062690 de 30/09/2009

(87) **Publicação PCT:** WO 2010/037780 de 08/04/2010

(85) **Data da Fase Nacional:** 30/03/2011

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO QUÍMICO-ALVO DERIVÁVEL DA BIOMASSA CELULÓSICA, SISTEMA PARA PRODUÇÃO DO DITO PRODUTO, E USO DE UM FUNGO FILAMENTOSO RECOMBINANTE, MUTANTE OU DO TIPO SELVAGEM. A presente invenção refere-se a um método para a preparação de um produto químico-alvo derivável da biomassa celulósica, envolvendo a desintoxicação do hidrolisado gasto. O método compreende as etapas de fornecer biomassa celulósica, submeter a biomassa celulósica a pré-tratamento aquoso, hidrólise aquosa e fermentação sob condições em que pelo menos uma parte dos açúcares fermentáveis é fermentada em um produto químico-alvo primário, separar o produto químico-alvo primário do hidrolisado fermentado para fornecer um hidrolisado gasto que compreende substâncias inibidoras e desintoxicar o hidrolisado gasto pela diminuição da concentração de pelo menos uma das substâncias inibidoras, usando um biocatalisador de desintoxicação selecionado do grupo que consiste em fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem e recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado, opcionalmente após purificação adicional.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO QUÍMICO-ALVO DERIVÁVEL DA BIOMASSA CELULÓSICA, SISTEMA PARA PRODUÇÃO DO DITO PRODUTO, E USO DE UM FUNGO FILAMENTOSO RECOMBINANTE, MUTANTE OU DO TIPO SELVAGEM"**.

Campo Técnico da Invenção

A presente invenção refere-se a um método para a preparação de um produto químico-alvo a partir de biomassa celulósica, a um sistema para a preparação de um produto químico-alvo a partir de biomassa celulósica e ao uso de fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem para desintoxicar o hidrolisado celulósico gasto.

Antecedentes da Invenção

O aquecimento global, a depleção do petróleo e a segurança energética têm sido as principais forças diretoras para o desenvolvimento de combustíveis renováveis que podem substituir os combustíveis derivados do petróleo, como a gasolina e o diesel. O etanol é atualmente o combustível automotivo renovável mais comumente usado. É amplamente produzido pela fermentação de matérias-primas que contêm amido ou açúcar, tais quais a cana-de-açúcar, milho e trigo. Entretanto, o fornecimento dessas safras é relativamente limitado, e muitas delas podem ser consideradas como recursos alimentares humanos. Outra desvantagem é que a produção de etanol a partir da maioria de tais matérias-primas rende um ganho de energia líquido relativamente baixo e uma baixa eficiência de CO₂ renovável, ou seja, a quantidade de CO₂ fóssil produzida durante a cadeia de produção quando da produção de etanol a partir destes materiais é alta. A lignocelulose é uma matéria-prima mais abundante e mais barata e que pode render um ganho energético líquido superior.

A lignocelulose é primariamente composta de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é composta de cadeias de polissacarídeos de diversas centenas até mais de dez mil unidades de glicose ligadas, enquanto a hemicelulose é um polissacarídeo composto de xilose, outros açúcares de pentose e diversos açúcares de hexose. A celulose e a hemicelulose estão fortemente associadas à lignina, um composto polifenólico que liga os poli-

meros de celulose e hemicelulose, assim fornecendo à madeira rigidez e força mecânica.

Na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, diversas etapas de hidrólise e pré-tratamento são usadas para degradar os polissacarídeos de celulose e hemicelulose na lignocelulose em monossacarídeos. Micro-organismos podem então ser usados para fermentar os monossacarídeos para álcool. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual metaboliza açúcares de hexose, é um dos micro-organismos mais adequados para a produção de etanol e é favorecida em processos industriais.

Entretanto, à medida que a lignocelulose é degradada, um amplo espectro de substâncias é liberado, algumas das quais podem ser tóxicas e inibir os micro-organismos, por exemplo, a levedura *S. Cerevisae*, a qual é usada para a fermentação do etanol. Ademais, as substâncias inibidoras também podem limitar taxas das enzimas usadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. A natureza e a quantidade de substâncias inibidoras dependem do tipo de matéria-prima de lignocelulose e dos processos de pré-tratamento e hidrólise usados. Exemplos de substâncias inibidoras incluem ácidos alifáticos como o ácido acético, o qual é liberado à medida que a fração de hemicelulose é degradada, aldeídos de furano, furfural e diferentes compostos fenólicos. Assim, a presença de tais substâncias inibidoras resulta em um menor rendimento e produtividade de etanol.

Ademais, é desejável que se recicle a água de processo em uma planta de produção de etanol para, por exemplo, minimizar a adição de água fresca e, conseqüentemente, minimizar os custos de produção e/ou reduzir o impacto ambiental. Entretanto, a reciclagem da água de processo pode levar a uma acumulação e aumento na concentração de substâncias inibidoras, o que é um obstáculo para o reuso da água de processo. Há diversos meios de se evitar problemas relacionados a inibidores, mas eles frequentemente estão associados com custos adicionais de processo ou outros problemas.

WO 01/60752 revela um processo para tratamento do efluente de água usada para diminuir os níveis de substâncias inibidoras quando se produz etanol a partir de lignocelulose. Entretanto, WO 01/6752 envolve uma

complexa digestão anaeróbica com metano produzindo micro-organismos antes do reuso do efluente de água usada.

Palmqvist et al. (Enzimal and Microbial Technology. 1997, 20, pp. 286 – 293) revelam um método para simultaneamente produzir enzimas e desintoxicar os hidrolisados de hemicelulose. Entretanto, o método envolve desintoxicação com *Trichoderma reesei* antes da fermentação com etanol, significando que hexoses são consumidas por *T. Reesei* antes da fermentação em vez de serem usadas para a produção de etanol, e a recirculação da água de processo se inicia antes da fermentação, significando que somente uma pequena parte de toda a água de processo é recirculada.

Resumindo, a técnica anterior não fornece um método atrativo para a produção de etanol que seja simples e possibilite a desintoxicação e a recirculação da água de processo.

Sumário da Invenção

É um objetivo de alguns aspectos da presente descrição fornecer redução de as quantidades de água fresca necessárias para a produção de um produto químico-alvo, tal como o etanol, e/ou das quantidades de água de despejo formada em tal produção.

Ademais, é um objetivo de alguns aspectos da presente descrição fornecer um sistema para a produção de um produto químico-alvo, como o etanol, a partir de biomassa lignocelulósica.

Ademais, é um objetivo de alguns aspectos da presente descrição fornecer redução de subprodutos tóxicos e/ou inibidores envolvendo a desintoxicação do hidrolisado gasto, que compreende as etapas de:

- a) fornecer biomassa celulósica;
- b) submeter a biomassa celulósica a pelo menos um fluido aquoso de pré-tratamento de modo a fornecer biomassa celulósica pré-tratada;
- c) submeter a biomassa celulósica pré-tratada a pelo menos um líquido aquoso hidrolisante, opcionalmente contendo enzimas de sacarificação, sob condições em que pelo menos parte da biomassa celulósica pré-tratada é hidrolisada em um hidrolisado celulósico, tal hidrolisado celulósico compreendendo açúcares fermentáveis e substâncias inibidoras;

d) submeter os açúcares fermentáveis à fermentação em um líquido aquoso, a fermentação usando pelo menos um biocatalisador de fermentação sob condições em que pelo menos uma parte dos açúcares fermentáveis é fermentada em um produto químico-alvo primário;

5 e) separar o produto químico-alvo primário do hidrolisado fermentado para fornecer um hidrolisado gasto compreendendo substâncias inibidoras;

f) desintoxicar o hidrolisado gasto pela diminuição da concentração de pelo menos uma das substâncias inibidoras usando um biocatalisador de desintoxicação selecionado do grupo que consiste em fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem, de modo a fornecer um hidrolisado gasto desintoxicado;

g) recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado, opcionalmente após purificação adicional, como parte de um líquido aquoso fornecido em pelo menos uma das etapas b), c) e d).

Em uma modalidade, o biocatalisador de fermentação da etapa d) é levedura, e o produto químico-alvo primário da etapa d) é o etanol.

Em uma modalidade, o biocatalisador de fermentação é *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, mutante ou do tipo selvagem.

20 Em uma modalidade, a biomassa celulósica da etapa a) é selecionada de material de madeira, papel rejeitado, resíduos de agricultura, como o bagaço e safras energéticas.

Em uma modalidade, o líquido de pré-tratamento da etapa b) possui um pH menor que 5.

25 Em uma modalidade, o produto químico-alvo primário é separado do hidrolisado fermentado na etapa e) por meio de destilação.

Em uma modalidade, as substâncias inibidoras compreendem aldeídos de furano, como o furfural e/ou HMF, ácidos alifáticos e/ou compostos fenólicos.

30 Em uma modalidade, o biocatalisador de desintoxicação da etapa f) é um fungo selecionado de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*, recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem ou uma combinação destes.

Em uma modalidade, o biocatalisador de desintoxicação é *Apergillus niger* recombinante, mutante ou do tipo selvagem.

Em uma modalidade, o biocatalisador de desintoxicação produz enzimas durante a desintoxicação na etapa f).

5 Em uma modalidade, as enzimas de sacarificação obtidas na etapa f) são adicionadas ao líquido hidrolisante aquoso na etapa c).

Um aspecto da invenção fornece um sistema para a produção de pelo menos um produto químico-alvo derivável de biomassa celulósica, compreendendo:

10 a) pelo menos um recipiente de pré-tratamento de biomassa celulósica para pré-tratamento de pelo menos uma parte da biomassa celulósica fornecida à biomassa celulósica pré-tratada, conectado a

b) um recipiente de hidrólise para hidrolisar pelo menos uma parte da biomassa celulósica pré-tratada para hidrolisado celulósico, tal hidrolisado celulósico compreendendo açúcares fermentáveis e substâncias inibidoras, ainda conectado a

c) um recipiente de fermentação compreendendo um biocatalisador de fermentação para fermentar pelo menos uma parte dos açúcares fermentáveis, fornecendo um hidrolisado fermentado que compreende o produto químico-alvo primário e substâncias inibidoras, ainda conectado a

d) um primeiro meio de separação, para separar o produto químico-alvo primário do hidrolisado fermentado e para fornecer um hidrolisado gasto, ainda conectado a

e) um recipiente de desintoxicação, compreendendo um biocatalisador de desintoxicação selecionado do grupo que consiste em um fungo filamentoso recombinante, mutante ou do tipo selvagem para desintoxicar o hidrolisado gasto de pelo menos uma substância inibidora e para fornecer um hidrolisado gasto desintoxicado, ainda conectado a

f) meios de recirculação para recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado para pelo menos um do pelo menos um recipiente de pré-tratamento de a), recipiente de hidrólise de b) e recipiente de fermentação de c), em que o recipiente de hidrólise e o recipiente de fermen-

tação podem ser o mesmo recipiente ou dois recipientes diferentes.

Em uma modalidade, o recipiente de desintoxicação de e) está conectado aos meios de recirculação f) via um segundo meio de separação para separar o biocatalisador de desintoxicação de pelo menos parte do hi-

5 drolisado gasto desintoxicado.

Outro aspecto da invenção fornece o uso de um fungo filamen-
toso recombinante, mutante ou do tipo selvagem para desintoxicar o hidrolisado celulósico gasto. Uma modalidade fornece o uso de *Aspergillus niger* recombinante, mutante ou do tipo selvagem para desintoxicar o hidrolisado
10 celulósico gasto.

• Descrição Detalhada da Invenção

Como um aspecto da invenção, é fornecido um método para preparar pelo menos um produto químico-alvo derivável de biomassa celulósica envolvendo desintoxicar o hidrolisado gasto, compreendendo as etapas de:

15 a) fornecer biomassa celulósica;

b) submeter a biomassa celulósica a pelo menos um fluido aquoso de pré-tratamento de modo a fornecer biomassa celulósica pré-tratada;

c) submeter a biomassa celulósica pré-tratada a pelo menos um
20 líquido aquoso hidrolisante, opcionalmente contendo enzimas de sacarificação, sob condições em que pelo menos parte da biomassa celulósica pré-tratada é hidrolisada em um hidrolisado celulósico, tal hidrolisado celulósico compreendendo açúcares fermentáveis e substâncias inibidoras;

d) submeter os açúcares fermentáveis à fermentação em um líquido aquoso, a fermentação usando pelo menos um biocatalisador de fermentação sob condições em que pelo menos uma parte dos açúcares fermentáveis é fermentada em um produto químico-alvo primário;

e) separar o produto químico-alvo primário do hidrolisado fermentado para fornecer um hidrolisado gasto compreendendo substâncias
30 inibidoras;

f) desintoxicar o hidrolisado gasto pela diminuição da concentração de pelo menos uma das substâncias inibidoras usando um biocatalisa-

dor de desintoxicação selecionado do grupo que consiste em fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem, de modo a fornecer um hidrolisado gasto desintoxicado;

- g) recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado, opcionalmente após purificação adicional, como parte de um líquido aquoso fornecido em pelo menos uma das etapas b), c) e d).

No contexto da presente descrição, um produto químico-alvo derivável de biomassa celulósica se refere a um produto químico que pode ser derivado de ou produzido a partir de biomassa celulósica por reações químicas. Exemplos de produtos químicos alvos deriváveis de celulose incluem alcoóis, como o etanol e o butanol, ácidos, alcanos, alquenos, aromáticos, aldeídos, cetonas, biopolímeros, proteínas, peptídeos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos e outros farmacêuticos.

A biomassa celulósica se refere ao material biológico feito de celulose. A biomassa celulósica pode ser biomassa lignocelulósica, ou seja, biomassa que compreende celulose, hemicelulose e lignina.

A biomassa celulósica pode ser fornecida em uma forma moída de biomassa celulósica, tal como biomassa celulósica moída para um tamanho de 1 a 100 mm, como de 1 a 80 mm, como de 1 a 50 mm. Outras formas de biomassa celulósica são bem conhecidas pelos técnicos no assunto.

Sem limitação, a biomassa celulósica da etapa a) pode ser selecionada de material lenhoso, rejeitos de papel, resíduos de agricultura, tal como o bagaço e safras energéticas.

Essas fontes de biomassa celulósica são matérias-primas abundantes que podem render um ganho energético líquido maior e possuem uma alta eficiência de CO₂ renovável. O material lenhoso pode ser resíduo florestal, como lascas de madeira ou rejeitos de serrarias e fábricas de papel. Os rejeitos de papel podem ser papel reciclado ou cartolinas. Os resíduos de agricultura podem ser palha de milho, fibras de milho, palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, palha de arroz ou palha de soja e safras energéticas podem ser árvores de rápido crescimento ou gramíneas lenhosas. Outras fontes de biomassa celulósica são bem conhecidas

pelos técnicos no assunto.

A etapa b) pode ser realizada submetendo a biomassa celulósica a pelo menos um fluido de pré-tratamento aquoso sob condições em que pelo menos uma parte da biomassa celulósica é hidrolisada. A etapa b) pode, por exemplo, aumentar a acessibilidade da celulose e hemicelulose às enzimas de sacarificação se tais são usadas para hidrólise na etapa c). A etapa b) pode ocorrer em um recipiente de pré-tratamento de biomassa celulósica. O fluido de pré-tratamento aquoso pode ser um líquido ou um gás ou uma mistura entre um líquido e um gás. Submissão da biomassa celulósica a pelo menos um fluido de pré-tratamento aquoso pode ser realizada por diferentes técnicas conhecidas pelos técnicos no assunto. Assim, a etapa b) pode envolver um ou diversos pré-tratamentos, como pré-tratamento com um fluido aquoso seguido de pré-tratamento com outro fluido aquoso. Como exemplos, o pré-tratamento pode envolver pré-hidrólise, impregnação, vaporização, explosão de vapor ou qualquer combinação destes. A vaporização se refere a um processo usado para retirar o ar da biomassa celulósica de modo a facilitar a hidrólise da celulose. A explosão de vapor se refere a um processo que combina vapor, forças de cisalhamento e hidrólise para romper as fibras celulósicas. O fluido de pré-tratamento pode compreender ácido de modo que a celulose dentro das fibras de celulose se torne acessível para as etapas de hidrólise seguintes. Por exemplo, o pH do fluido de pré-tratamento pode ser de 0,5 a 5. Como outro exemplo, se o pré-tratamento é a impregnação, o fluido de pré-tratamento pode ser um ácido diluído com pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado recirculado de modo que o fluido de pré-tratamento possua um pH de 0,5 a 5, tal qual de 0,5 a 2. O intervalo inferior de pH pode ser benéfico se uma biomassa celulósica derivada de madeira é usada. Ademais, o fluido de pré-tratamento pode, por exemplo, ser aplicado a altas temperaturas, como de 50 a 220°C, preferivelmente de 100 a 220°C sob alta pressão, como uma pressão mais alta que a pressão atmosférica. Tipicamente, o pré-tratamento é realizado sob alta pressão se a temperatura do líquido de pré-tratamento for de 100°C ou mais. O fluido de pré-tratamento também pode ser um líquido alcalino ou um líqui-

do orgânico.

Se biomassa lignocelulósica for usada, o pré-tratamento da biomassa de lignocelulose pode ser realizado usando um fluido sob condições tais que parte da celulose e hemicelulose é liberada da lignina.

5 O fluido de pré-tratamento aquoso da etapa b) pode ser um líquido com um pH abaixo de 5, como abaixo de 4, abaixo de 3, abaixo de 2. Líquidos de pH baixo, tais quais soluções ácidas, são conhecidos por serem eficazes para hidrolisar e dissolver celulose e hemicelulose, assim permitindo uma boa acessibilidade da celulose a hidrólises posteriores.

10 Como exemplo, o pré-tratamento pode ser a impregnação da biomassa celulósica e, em tal caso, o fluido de pré-tratamento aquoso pode compreender pelo menos parte do hidrolisado gasto desintoxicado recirculado e um ácido. Por exemplo, o pH de tal fluido de pré-tratamento aquoso pode ser de 0,5 a 5, tal qual de 0,5 a 2. Alternativamente, em uma impregnação, o ácido pode ser adicionado como um gás e o fluido de pré-tratamento aquoso pode ser adicionado como um líquido e compreender pelo menos parte do hidrolisado gasto desintoxicado recirculante.

Submissão da biomassa celulósica pré-tratada a um líquido hidrolisante aquoso, opcionalmente contendo enzimas de sacarificação, sob condições em que pelo menos uma parte da biomassa celulósica pré-tratada é hidrolisada, se refere a submeter a biomassa celulósica pré-tratada a um líquido hidrolisante aquoso, de modo que uma parte substancial dos polissacarídeos da biomassa celulósica seja despolimerizada em açúcares livres. Se biomassa lignocelulósica for usada, a lignina também pode ser removida da biomassa celulósica. Preferivelmente, pelo menos 95% de toda a lignina são separados dos carboidratos durante esta etapa. Os açúcares livres são, por exemplo, pentoses e hexoses, ou seja, monossacarídeos com 5 ou 6 átomos de carbono, respectivamente. Esta etapa pode ocorrer em um recipiente de hidrólise.

30 O líquido hidrolisante aquoso pode compreender enzimas. As enzimas podem ser enzimas de sacarificação, ou seja, enzimas que podem converter ou hidrolisar a biomassa celulósica pré-tratada em açúcares livres.

Tais enzimas de sacarificação podem ser glicosidases, as quais hidrolisam polissacarídeos. Exemplos de glicosidases incluem glicosidases que hidrolisam celulose, como as celulases, endoglucanases, exoglucanases, celbiohidrolase e β -glicosidase, glicosidase que hidrolisa hemicelulose, tais como as xilanases, endoxilanases, exoxilanases, β -xilosidases, arabinoxilases, manases, galactases, pectinases e glicoronases e glicosidases que hidrolisam amido como as amilases, α -amilases, β -amilases, glicoamilases, α -glicosidases e isoamilases, ou qualquer enzima no grupo das enzimas encontradas em EC 3.2.1.x, como a EC 3.2.1.4, em que EC é o número de comissão da enzima.

Por exemplo, a enzima de sacarificação pode ser a endoglucanase de *Hypocrea jecorina* Cel7B.

Alternativamente, o líquido hidrolisante aquoso pode compreender pelo menos um ácido mineral e/ou ácido sulfuroso, o qual pode ser adicionado ao líquido como gás. Tal líquido hidrolisante é adequado para hidrólise ácida da biomassa. Por exemplo, o ácido mineral pode ser o ácido sulfúrico, ácido clorídrico ou ácido nítrico. A hidrólise ácida pode ser realizada em um determinado pH, uma determinada temperatura e uma determinada pressão durante um determinado período de tempo. A hidrólise ácida da biomassa celulósica pré-tratada é uma técnica bem conhecida, e um técnico no assunto saberia ajustar o pH, ou seja, a quantidade de ácido adicionado, temperatura, pressão e tempo de modo a conseguir um resultado satisfatório. Por exemplo, o pH do líquido hidrolisante

podem ser substâncias que são inibidoras da fermentação da etapa d), por exemplo, para levedura. O nível de inibição causado pela substância inibidora depende, é claro, de suas concentrações. Por exemplo, as substâncias inibidoras podem ser selecionadas de substâncias que são inibidoras ou limitantes da taxa de fermentação da etapa d) em uma concentração de 100 mM. Um técnico no assunto conhece exemplos de tais substâncias inibidoras que resultam da hidrólise da celulose. Por exemplo, ele pode encontrar tais exemplos em Taherzadeh et al. (2000), Larsson et al. (1999) e/ou Larsson et al. (2000) referidos abaixo. As substâncias inibidoras podem conter:

5 furanos, tais como aldeídos de furano, os quais podem ser inibidores em uma concentração de 30 mM (ou mais) (Taherzadeh et al. 2000 Appl Microbiol Biotechnol 53, 701 -708); ácidos alifáticos, os quais podem ser inibidores em uma concentração de 100 mM (ou mais) (Larsson et al. 1999 Enzyme Microb Technol 24, 151 -159); e/ou compostos fenólicos, os quais podem ser

15 inibidores em uma concentração de 0,1 mM (ou mais) (Larsson et al. 2000 Appl Biochem Biotechnol 84-86, 617-632). Sabe-se que estes compostos inibem a levedura *S. Cerevisiae*, o que resulta em menor produtividade e rendimento de etanol. Exemplos de aldeídos de furano podem ser furfural ou 5-hidróxi-metil-furfural (HMF) e o ácido alifático pode ser o ácido acético.

20 Submissão de açúcares fermentáveis à fermentação em um líquido aquoso usando pelo menos um biocatalisador de fermentação sob condições em que pelo menos uma parte do hidrolisado de celulose é fermentado em um produto químico-alvo primário se refere a usar pelo menos um biocatalisador de fermentação para fermentar açúcares livres em produtos químicos alvos primários do processo. Assim, a fermentação da etapa d)

25 pode ser realizada por um ou diversos tipos de biocatalisadores de fermentação. Um biocatalisador de fermentação se refere a uma substância ou micro-organismo que faz com que açúcares livres se quebrem nos produtos químicos alvos primários, por exemplo, por quebra anaeróbica. Essa etapa

30 pode ocorrer em um recipiente de fermentação.

A fermentação aquosa pode compreender um líquido de fermentação aquoso. O líquido de fermentação aquoso pode compreender o pelo

menos um biocatalisador de fermentação. Ademais, o pelo menos um biocatalisador de fermentação pode ser imobilizado.

O biocatalisador de fermentação da etapa d) pode ser levedura, e o produto químico-alvo primário da etapa d) pode ser etanol.

5 No contexto da presente descrição, levedura refere-se a membros unicelulares das famílias de fungos. As leveduras são conhecidas por serem capazes de fermentar açúcares em moléculas mais simples. Leveduras de *Saccharomyces*, *Pichia* e *Candida* podem ser usadas como biocatalisadores de fermentação. O etanol é um exemplo de um produto químico que
10 é derivável da celulose e pode ser produzido por levedura através da fermentação. Outros exemplos de produtos químicos alvos deriváveis de celulose incluem outros alcoóis como o butanol, ácidos, alcanos, alquenos, aromáticos, aldeídos, cetonas, biopolímeros, proteínas, peptídeos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos e outros produtos farmacêuticos. O biocatalisador de
15 fermentação pode ser *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, mutante ou do tipo selvagem. *Saccharomyces cerevisiae* é um dos micro-organismos mais adequados para a produção de etanol a partir de açúcares de hexose e é favorecido em processos industriais.

 Alternativamente, ou como complemento, o biocatalisador de
20 fermentação pode ser separado do hidrolisado fermentado após a fermentação da etapa d).

 A separação do produto químico-alvo primário e, se aplicável, do biocatalisador de fermentação do hidrolisado fermentado se refere à remoção do produto químico-alvo primário e, se aplicável, do biocatalisador de
25 fermentação do hidrolisado fermentado. Preferivelmente, pelo menos 95% do químico-alvo e, se aplicável, do biocatalisador de fermentação são removidos em tal separação. Essa etapa pode ocorrer em um primeiro meio de separação. O hidrolisado fermentado pode compreender o produto químico-alvo primário, açúcares não fermentados e substâncias inibidoras.

30 O produto químico-alvo primário pode ser separado do hidrolisado fermentado na etapa e) por meio de destilação. A destilação se refere à separação de uma mistura de líquidos em seus componentes com base nas

diferenças entre os pontos de ebulição. Como exemplo, se o produto químico-alvo é o etanol, a destilação é um método preferível para separar o etanol do hidrolisado fermentado devido ao ponto de ebulição mais baixo do etanol se comparado a outras substâncias compreendidas no hidrolisado fermentado. O hidrolisado resultante pode assim ser um hidrolisado gasto que compreende as substâncias inibidoras conforme descrito acima. Como exemplo, o hidrolisado gasto pode ser uma vinhaça, ou seja, o efluente gasto após a destilação.

A desintoxicação do hidrolisado gasto da pelo menos uma substância inibidora se refere a submeter o hidrolisado gasto a um tratamento de modo a reduzir os níveis ou concentrações da pelo menos uma substância inibidora. Por exemplo, a concentração da pelo menos uma substância inibidora pode ser reduzida em pelo menos 50%. Ademais, o nível ou a concentração da pelo menos uma substância inibidora é preferivelmente reduzida de tal forma que no método mencionado acima para a preparação de pelo menos um produto químico-alvo derivável de biomassa celulósica envolvendo a desintoxicação de um hidrolisado gasto e a recirculação do hidrolisado desintoxicado, a pelo menos uma substância inibidora não é inibidora ou limitadora de taxa na etapa c) ou d) do método. "Não ser inibidora ou limitadora de taxa" em uma etapa pode ser reduzir o rendimento da etapa em 1% ou menos, tal como 0,5% ou menos, 0,1% ou menos.

Entretanto, o principal propósito da desintoxicação é impedir a acumulação no método (o qual compreende a recirculação). Consequentemente, a desintoxicação pode ser reduzir o nível ou a concentração da pelo menos uma substância inibidora de modo a prevenir a acumulação da substância.

Essa etapa de desintoxicação pode ocorrer em um recipiente de desintoxicação. O biocatalisador de desintoxicação é selecionado do grupo que consiste em fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem. Fungos filamentosos se referem a fungos que vivem como filamentos pluricelulares (hifas), e que formam um micélio. Fungos filamentosos do tipo selvagem se referem à cepa de origem dos fungos filamentosos, ou

seja, fungos filamentosos que são encontrados naturalmente, ou selvagens, enquanto fungos filamentosos mutantes se referem a fungos filamentosos que diferem dos fungos filamentosos do tipo selvagem por uma ou mais mutações funcionais, ou seja, possuem uma ou mais mudanças permanentes no material genético que afeta o fenótipo. Fungos filamentosos recombinantes se referem a fungos filamentosos que contêm DNA de uma ou mais fontes adicionais, por exemplo, que possuem uma adição relevante de DNA, como o plasmídeo de uma bactéria no genoma. Os fungos recombinantes ou mutantes fornecidos possuem pelo menos 10%, preferivelmente pelo menos 50%, tal qual pelo menos 90% da capacidade de consumir as substâncias inibidoras do fungo do tipo selvagem correspondente. Ademais, os fungos recombinantes ou mutantes fornecidos podem possuir uma maior capacidade de consumir as substâncias inibidoras se comparados ao tipo selvagem. Exemplos de tais substâncias inibidoras são mencionados acima. A capacidade de consumir as substâncias inibidoras pode, por exemplo, ser realizada de acordo com os Exemplos, seção Análises Químicas abaixo. Um técnico no assunto entende como comparar tal capacidade de um fungo do tipo selvagem com a de um mutante ou recombinante.

Os inventores notaram que os fungos filamentosos representam um grupo de organismos que é tipicamente caracterizado pela capacidade de crescer em substratos simples e baratos, por possuírem uma alta versatilidade metabólica, um estilo de vida saprofítico ligado a uma capacidade de degradar diversas substâncias orgânicas diferentes, adequabilidade para uso em processos aeróbicos e uma capacidade bem desenvolvida de secretar metabólitos e proteínas. Tais características, as quais são comumente compartilhadas por diferentes espécies de fungos filamentosos, fazem deles um grupo de organismos adequado para uso da mesma conforme demonstrado com relação aos fungos do gênero *Aspergillus* que podem ser tidos como um organismo modelo entre os fungos filamentosos (Baker SE (2006) *Medical Mycology* 44, S17 – S21).

O biocatalisador de desintoxicação da etapa f) pode ser um fungo filamentoso selecionado de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*

recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem ou uma combinação destes. Na presente descrição, *Aspergillus* mostrou possuir excelentes capacidades de desintoxicação, e todos os inibidores testados serviram como um excelente meio de cultivo para *Aspergillus*. *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Mucor* são

5 fungos filamentosos que compartilham características relevantes com *Aspergillus*. Por exemplo, os inventores notaram que *Hypocrea jecorina* (frequentemente chamado de *Trichoderma reesei*) cresce bem em vinhaça gasta de uma destilação de um caldo de fermentação de uma fermentação de hidrolisado de lignocelulose. Também foi descoberto que o fungo produzia

10 atividade enzimática (atividade de xilanase), enquanto crescia. Juntos, isto indica atividade de desintoxicação. Ademais, mostra que *Hypocrea jecorina* pode ser empregado em modalidades que também envolvem a produção de enzimas discutida a seguir. Outros fungos filamentosos que podem ser usados são *Trametes*, *Sclerotium*, *Aureobasidium*, *Schizophyllum*, *Acremonium*,

15 *Tolypocladium*, *Claviceps*, *Monascus*, *Taxomyces*, *Fusarium* e *Agaricus*. Combinações de fungos filamentosos de diferentes famílias também podem ser usadas, tais como fungos filamentosos de ambos *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Os fungos filamentosos podem ser *Aspergillus niger* recombinante, mutante ou do tipo selvagem. Na presente descrição, *Aspergillus niger* mostrou possuir excelentes capacidades de desintoxicação, e todos os inibidores testados serviram como um excelente meio de cultivo de *A. niger*. Outras espécies úteis de *Aspergillus* podem ser *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. clavatus*, *A. deflectus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. penicilloides*, *A. restrictus*,

25 *A. sojae*, *A. sydowi*, *A. tamari*, *A. terreus*, *A. ustus* ou *A. Versicolor* recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem.

Aspergillus niger pode ser uma cepa que expressa a endoglucanase de *Hypocrea jecorina* Cel7B. Na presente descrição, uma cepa de *Aspergillus niger* que expressa a endoglucanase de *Hypocrea jecorina* Cel7B

30 mostrou possuir capacidades de desintoxicação, e todos os inibidores serviram como um excelente meio de cultivo para esta cepa de *A. Niger*. Entre-

tanto, essa cepa é somente um exemplo de muitos que podem ser empregados no contexto da presente descrição.

O biocatalisador de desintoxicação pode produzir enzimas durante a desintoxicação na etapa f). A produção de enzimas pode ser endógena ou pode ser conseguida através da inserção do DNA de qualquer enzima no genoma do biocatalisador de desintoxicação, ou seja, usando um biocatalisador de desintoxicação recombinante. Enzimas adequadas podem ser quaisquer enzimas industriais importantes, como xilanases, amilases, ligninases, celulases, celobiases ou proteases.

As enzimas podem ser enzimas de sacarificação. Enzimas de sacarificação são conforme referenciadas acima, ou seja, enzimas que podem converter ou hidrolisar a biomassa celulósica pré-tratada em açúcares livres. Uma enzima de sacarificação pode ser a endoglucanase de *Hypocrea jecorina*. Na presente descrição, um biocatalisador de desintoxicação que produz enzimas de sacarificação exibiu excelentes capacidades de desintoxicação. Ademais, todos os inibidores testados serviram como um excelente meio de cultivo para o biocatalisador de desintoxicação que produz enzimas de sacarificação. As enzimas produzidas por ser purificadas e usadas em diferentes aplicações.

As enzimas de sacarificação produzidas na etapa f) podem ser adicionadas ao líquido hidrolisante aquoso na etapa c). A recirculação se refere ao uso de pelo menos uma parte das enzimas de sacarificação obtidas na etapa f), como parte do líquido hidrolisante aquoso que compreende enzimas de sacarificação na etapa c). Isto é ilustrado de forma esquemática na Figura 2. A recirculação das enzimas de sacarificação produzidas é uma maneira excelente de minimizar o uso de enzimas externas quando da hidrólise da celulose e hemicelulose antes da fermentação.

O catalisador de desintoxicação pode ser imobilizado.

Alternativamente, ou como complemento, o biocatalisador de desintoxicação pode ser separado do hidrolisado gasto desintoxicado, o que se refere a remover o biocatalisador de desintoxicação do hidrolisado. Preferivelmente, pelo menos 95% em peso do biocatalisador de desintoxicação

são removidos em tal separação. Essa etapa pode ocorrer em um segundo meio de separação. Como exemplo, diversas técnicas de filtragem podem ser usadas. O biocatalisador de desintoxicação pode ser usado para vários propósitos. Como exemplo, o biocatalisador de desintoxicação separado po-

5 de ser usado como uma fonte de proteína em vários produtos, como uma fonte de proteína para ração bovina. Ademais, o biocatalisador de desintoxicação pode ser separado por meio de sedimentação por centrifugação.

Recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado, opcionalmente após purificação adicional, como uma parte do líquido

10 aquoso fornecido em pelo menos uma das etapas b), c) ou d) se refere a reusar pelo menos uma parte do hidrolisado gasto de desintoxicação obtido na etapa f) como uma parte do líquido de pré-tratamento aquoso da etapa b), do líquido hidrolisante aquoso da etapa c) ou do líquido de fermentação aquoso da etapa d). Essa etapa pode ocorrer em meios de recirculação. A

15 purificação adicional se refere a meios adicionais para diminuir os níveis ou concentrações das substâncias inibidoras do hidrolisado gasto desintoxicado. Tal purificação adicional pode compreender etapas diferentes de filtração e/ou adsorção. O hidrolisado gasto desintoxicado pode ser recirculado como uma parte dos líquidos aquosos acima mencionados e podem ser mistura-

20 dos com água fresca antes de serem recirculados.

A invenção se baseia na compreensão de que o uso de fungos filamentosos para a desintoxicação do hidrolisado gasto após a fermentação para fornecer o produto químico-alvo leva a um nível surpreendentemente baixo de substâncias inibidoras, de modo que o hidrolisado desintoxicado

25 pode ser recirculado para qualquer parte do processo. Assim, descobriu-se que os fungos filamentosos usam um amplo espectro de compostos como nutrientes e compostos que inibem enzimas de sacarificação e a fermentação do biocatalisador, conforme visto nos Exemplos 1 a 3. Assim, o uso de fungos filamentosos remove substâncias derivadas de celulose ou lignocelu-

30 lose e assim facilita a reciclagem da água de processo. Ademais, a desintoxicação do hidrolisado gasto, ou seja, o hidrolisado obtido após separar o produto químico-alvo primário do hidrolisado fermentado, possibilita a recir-

culação de uma parte substancial da água usada no método para a preparação do produto químico-alvo. Ademais, o uso de fungos filamentosos minimiza a necessidade de água fresca na produção do produto químico-alvo derivável de biomassa celulósica. Ademais, o método revelado vantajosamente usa a eficiente respiração aeróbica dos fungos filamentosos para a desintoxicação e, assim, não exige condições aeróbicas menos eficazes

O método de preparação revelado é ilustrado na figura 1 e na figura 2, e a desintoxicação usando fungos filamentosos é exemplificada nos Exemplos 1 a 5, os quais ilustram a eficácia e vantagens da invenção revelada.

Em uma modalidade, é proporcionado um método para a preparação de pelo menos um produto químico-alvo derivável de biomassa lignocelulósica, compreendendo as etapas de:

a) fornecer biomassa celulósica;

b) submeter a biomassa lignocelulósica a um líquido de pré-tratamento aquoso sob condições nas quais pelo menos uma parte da biomassa lignocelulósica é hidrolisada, de modo a fornecer biomassa lignocelulósica pré-tratada.

c) submeter a biomassa lignocelulósica pré-tratada a um líquido aquoso hidrolisante, opcionalmente contendo enzimas de sacarificação, sob condições em que pelo menos parte da biomassa lignocelulósica pré-tratada é hidrolisada, tal hidrolisado lignocelulósico compreendendo açúcares fermentáveis e substâncias inibidoras;

d) submeter o hidrolisado lignocelulósico a um líquido de fermentação aquoso compreendendo um biocatalisador de fermentação sob condições em que pelo menos uma parte do hidrolisado lignocelulósico é fermentado em um produto químico-alvo primário, de modo a fornecer um hidrolisado fermentado compreendendo um produto químico-alvo primário, substâncias inibidoras e o biocatalisador de fermentação;

e) separar o biocatalisador de fermentação e o produto químico-alvo primário do hidrolisado fermentado de modo a fornecer um hidrolisado gasto que compreende substâncias inibidoras;

f) desintoxicar o hidrolisado gasto de pelo menos uma substância inibidora usando um biocatalisador de desintoxicação selecionado do grupo que consiste em fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem, para fornecer um hidrolisado desintoxicado;

5 g) separar o biocatalisador de desintoxicação do hidrolisado desintoxicado para fornecer água de processo purificada; e

h) recircular pelo menos uma parte da água de processo purificada como uma parte do(s) líquido(s) aquosos em pelo menos uma das etapas b), c) e d).

10 Em uma modalidade preferida, é fornecido um método para a preparação de etanol derivável de material lenhoso lignocelulósico envolvendo a desintoxicação do hidrolisado gasto, compreendendo as etapas de :

a) fornecer material lenhoso lignocelulósico moído de 1 a 50 mm;

15 b) submeter o material lenhoso lignocelulósico a um líquido de pré-tratamento aquoso de pH entre 1 e 5 a uma temperatura de 100 a 220°C;

c) submeter o material lenhoso pré-tratado a um líquido hidrolisante aquoso que compreende enzimas de sacarificação, como celulase, em uma temperatura tal que a lignocelulose pré-tratada seja adicionalmente hi-

20 drolisada, de modo a fornecer lignina e um hidrolisado lignocelulósico, o qual compreende hexoses e pentoses livres e substâncias inibidoras, como furfural, aldeídos de furano, ácidos alifáticos e compostos fenólicos;

d) submeter o hidrolisado lignocelulósico a um líquido de fermentação aquoso compreendendo uma levedura, como *Saccharomyces cerevisiae*, sob condições em que pelo menos uma parte das hexoses e pentoses

25 são fermentadas em etanol;

e) separar a levedura do hidrolisado fermentado, por exemplo, por filtração e usando destilação para separar o etanol do hidrolisado fermentado, de modo a fornecer um hidrolisado gasto;

30 f) desintoxicar o hidrolisado gasto de pelo menos uma das substâncias inibidoras, como o furfural, aldeídos de furano, ácidos alifáticos e compostos fenólicos, usando *Aspergillus niger* recombinante, mutante ou do

tipo selvagem, para fornecer um hidrolisado desintoxicado;

g) separar o *Aspergillus niger* do hidrolisado desintoxicação para fornecer água de processo purificada; e

h) recircular pelo menos uma parte da água de processo purificada como uma parte do líquido aquoso em pelo menos uma das etapas b), c) e d).

Como um aspecto da invenção, é proporcionado um sistema para a produção de pelo menos um produto químico-alvo derivável de biomassa celulósica, compreendendo;

a) pelo menos um recipiente de pré-tratamento de biomassa celulósica para pré-tratamento de pelo menos uma parte da biomassa celulósica fornecida para biomassa celulósica pré-tratada, conectado a

b) um recipiente de hidrólise para hidrolisar pelo menos uma parte da biomassa celulósica pré-tratada para hidrolisado celulósico, tal hidrolisado celulósico compreendendo açúcares fermentáveis e substâncias inibidoras, ainda conectado a

c) um recipiente de fermentação compreendendo um biocatalisador de fermentação para fermentar pelo menos uma parte dos açúcares fermentáveis, fornecendo um hidrolisado fermentado que compreende o produto químico-alvo primário e substâncias inibidoras, ainda conectado a

d) um primeiro meio de separação, para separar o produto químico-alvo primário do hidrolisado fermentado e para fornecer um hidrolisado gasto, ainda conectado a

e) um recipiente de desintoxicação, compreendendo um biocatalisador de desintoxicação selecionado do grupo que consiste em um fungo filamentoso recombinante, mutante ou do tipo selvagem para desintoxicar o hidrolisado gasto de pelo menos uma substância inibidora e para fornecer um hidrolisado gasto desintoxicado, ademais conectado a

f) meios de recirculação para recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado para pelo menos um do pelo menos um recipiente de pré-tratamento de a), recipiente de hidrólise de b) e recipiente de fermentação de c),

em que o recipiente de hidrólise e o recipiente de fermentação podem ser o mesmo recipiente ou dois recipientes diferentes.

As atividades de pré-tratar pelo menos uma parte da biomassa celulósica fornecida em um recipiente de pré-tratamento de biomassa celulósica, hidrolisar pelo menos uma parte da biomassa celulósica pré-tratada em um recipiente de hidrólise, fermentar pelo menos uma parte dos açúcares fermentáveis em um recipiente de fermentação, separar o produto químico-alvo primário em um primeiro meio de separação, desintoxicar o hidrolisado gasto em um recipiente de desintoxicação, recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado em um meio de recirculação podem ser realizadas conforme descrito acima neste relatório descritivo.

O recipiente de desintoxicação de e) pode ser conectado ao meio de recirculação f) via um segundo meio de separação para separar o biocatalisador de desintoxicação de pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado.

A atividade de separar o biocatalisador de desintoxicação de pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado pode ser realizada conforme descrito acima neste relatório descritivo.

Em um aspecto da invenção, é proporcionado o uso de fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem para desintoxicar o hidrolisado lignocelulósico gasto.

Na maioria dos casos, hidrolisado lignocelulósico gasto se refere à vinhaça que resulta da destilação do caldo de fermentação resultante da fermentação da lignocelulose hidrolisada. A composição química de tal vinhaça difere da composição química da vinhaça resultante da destilação do caldo de fermentação resultante da fermentação de soluções que contêm açúcares tradicionais, como soluções que contêm açúcares derivados de amido (por exemplo, arroz ou trigo), beterrabas ou cana-de-açúcar. A diferença se deve em parte a substâncias que são formadas/liberadas durante a hidrólise da lignocelulose. Exemplos de substâncias que podem ser formadas durante a hidrólise da lignocelulose são furanos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos, as quais são identificadas como substâncias inibidoras na

presente descrição.

A vinhaça ou hidrolisado lignocelulósico gasto do presente aspecto é, portanto, diferente das vinhaças que aparecem em uma destilaria de arroz para bebidas alcoólicas ou qualquer produção de bebidas alcoólicas.

5 Fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem são referidos conforme descrição aqui. O uso de fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem remove uma quantidade surpreendentemente alta de substâncias inibidoras, e permite a recirculação do hidrolisado gasto desintoxicado. Além disso, o uso de fungos filamentosos
10 recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem minimiza o uso de água fresca necessária quando do preparo de produtos químicos alvos a partir de biomassa celulósica.

Os fungos filamentosos podem ser *Aspergillus niger* recombinante, mutante ou do tipo selvagem. Na presente descrição, o uso de *Aspergillus niger* mostrou remover uma quantidade surpreendentemente alta de substâncias inibidoras, e todos os inibidores testados serviram como um excelente meio de crescimento para *A. niger*. Outros membros de *Aspergillus* podem ser usados, tais quais aqueles mencionados acima nesta descrição.

Breve Descrição dos Desenhos

20 A figura 1 mostra um método para a produção de um produto químico-alvo a partir de biomassa celulósica de acordo com a presente descrição.

A figura 2 mostra uma modalidade do método revelado para a produção de um produto químico-alvo a partir de biomassa celulósica, em
25 que as enzimas de sacarificação produzidas são recirculadas.

A figura 3 mostra a atividade de endoglucanase durante a desintoxicação do hidrolisado de bagaço gasto no Exemplo 1. (♦) *A. niger* D15 [egl] cultivada em hidrolisado de bagaço gasto, (▲) *A. niger* D15 [egl] cultivada em meio padrão, (■) *A. niger* D15 [pGT] cultivada em hidrolisado de
30 bagaço gasto, (x) *A. niger* D15 [pGT] cultivada em meio padrão. As atividades de endoglucanase são calculadas como os valores médios das medições de atividades de duas culturas separadas. As barras de erro indicam

desvio padrão.

A figura 4 mostra a atividade de endoglucanase durante a remoção de inibidores do meio padrão usando *A. Niger* no Exemplo 3. (♦) *A. niger* D15 [egl] cultivada em meio padrão contendo 5 g/L de ácido acético. (■)

- 5 *A. niger* D15 [egl] cultivada em meio padrão contendo 0,5 g/L de vanilina, (▲) *A. niger* D15 [egl] cultivada em meio padrão contendo 0,2 g/L coniferil aldeído, (x) *A. niger* D15 [egl] cultivada em meio padrão, (□) *A. niger* D15 [egl] cultivada em meio padrão contendo 2 g/L de HMF, (◇) *A. niger* D15 [egl] cultivada em meio padrão contendo 1 g/L de furfural. As atividades de endo-
- 10 glucanase são calculadas como os valores médios das medições de atividades de duas culturas separadas. As barras de erro indicam desvio padrão.

Exemplos

Os seguintes exemplos não limitantes ilustrarão adicionalmente a presente invenção.

- 15 Exemplo 1. Desintoxicação do hidrolisado de bagaço gasto usando *Aspergillus niger*

Matéria prima

- Bagaço de cana-de-açúcar foi secado com a ar até ter um conteúdo de matéria seca de 96% e moído de modo a passar por uma triagem
- 20 de 2 mm.

Pré-tratamento

- 3 x 180 g de matéria-prima seca e moída foi misturada com 3 x 1800 g de ácido sulfúrico diluído em três cilindros de aço inoxidável separados, cada um com um volume total de 2,5 L. A concentração final de ácido
- 25 sulfúrico na mistura foi 2%. Os cilindros foram anexados a um rotor em banho de aquecimento com propileno glicol controlado por uma unidade de controle (Jaako Pöyry, Karlstad, Suécia). O pré-tratamento foi terminado, os cilindros foram rapidamente resfriados até a temperatura ambiente em um banho de água. Os sólidos e o líquido da mistura pré-tratada foram separados por filtração a vácuo. Os sólidos foram lavados com 3 x 5 L de H₂O de-
- 30 sionizada e secadas em um gabinete de secagem a 70°C por 72 horas. A fração líquida, daqui em diante referida como pré-hidrolisado de bagaço, foi

coletada e armazenada a 4°C.

Hidrólise

O material sólido pré-tratado (80 g de peso seco, DW) foi misturado com 800 g do pré-hidrolisado de bagaço em balões de vidro Erlenmeyer de 2.000 mL fechados com tampas de algodão (o experimento foi feito em quádrupla). O pH das misturas foi ajustado para 4,8 com NaOH. Preparações comercialmente disponíveis de celulase e celobiase (Celluclast 1,5 L, com uma atividade declarada pelo fornecedor de 700 unidades de endoglucanase (EGU)/g (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e Novozyme 188, com uma atividade declarada de 250 unidades de celobiase (CBU/g) (Sigma-Aldrich)) foram adicionadas à mistura em uma carga de 319 EGU/g de sólidos (DW) e 23 CBU/g de sólidos (DW), respectivamente. As misturas foram incubadas com agitação (Incubator Shaker modelo G25, New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, EUA) a 50°C e 150 rpm por 72 h. O pH das misturas foi medido e reajustado para 4,8 com NaOH a cada dez horas. Durante a hidrólise, a quantidade de glicose liberada nas misturas foi monitorada através de medições com um glicômetro (Glucometer Elite XL, Bayer AG, Leverkusen, Alemanha) a cada dez horas. Após a hidrólise, as misturas foram filtradas. O pH da fração líquida, daqui em diante referida como hidrolisado de bagaço, foi ajustado para pH 2,0 com HCl e foi então armazenado a 4°C para evitar crescimento microbiano durante o armazenamento.

Fermentação com *S. Cerevisiae*

Antes da fermentação, o pH dos hidrolisados de bagaço foi ajustado para 5,5 com NaOH. Os hidrolisados também foram completados com uma solução nutriente, rendendo uma concentração final de 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,025 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,38 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$, e 1 g/L de extrato de levedura. As fermentações dos hidrolisados de bagaço foram realizadas em balões de vidro paralelos de 50 mL equipados com magnetos para agitação e lacrados com tampas de borracha furadas por cânulas para remoção de CO_2 . Os balões foram inoculados com levedura de padeiro (*S. Cerevisiae*) (Jästbolaget, Rotebro, Suécia). Os balões com hidrolisado de bagaço receberam um inoculador, rendendo uma concentração de massa

celular de 1 g/L (DW). Os balões foram incubados a 30°C por 5 h em banho de água com agitação magnética (IKA-Werke, Staufen, Alemanha). Os níveis de glicose durante o curso da fermentação foram monitorados por medições contínuas com um glicômetro.

5 Destilação

Após a fermentação, as células de levedura foram removidas dos hidrolisados fermentados por centrifugação (Sorvall RC26 Plus, Dupont, Newtown, CT, EUA) a 1.500 g e 4°C por 6 minutos. O pH dos líquidos de hidrolisado fermentado foi ajustado para 7,0 com NaOH para impedir uma possível degradação de açúcares durante a destilação. Os líquidos de hidrolisado fermentado foram transferidos para balões com fundo redondo e algumas gotas de antiespumante foram adicionadas para evitar uma formação excessiva de bolhas durante a destilação. Artigos de vidro padrões para destilação foram usados para a montagem da destilação e um banho de aquecimento com propileno glicol foi usado como fonte de calor. A destilação continuou até que todo o etanol fosse separado dos líquidos de hidrolisado fermentado. As frações não-etanol remanescente nos balões de fundo redondo, daqui em diante chamadas de hidrolisado de bagaço gasto (SBH), foram coletadas e armazenadas a 4°C para uso futuro.

20 Cepas recombinante de *A. niger*

Um transformante de *A. niger* D15 recombinante que expressa o gene de Cel7B de *H. Jecorina* foi usado (a cepa foi designada *A. niger* D15[egl]). A expressão do gene de Cel7B estava sob controle de transcrição do promotor constitutivo de *gpd* de *A. niger* e o terminador *glA* de *Aspergillus awamori*. Um transformante com o mesmo promotor e terminador integrado no cromossomo, mas sem o gene de Cel7B foi usado como controle negativo (a cepa foi designada *A. niger* D15[pGT]). A construção das duas cepas recombinantes é descrita em Rose e van Zyl, 2002 (Rose, S. H. e van Zyl, W. H, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002, 58, pp. 461-468).

30 Experimento de desintoxicação com *A. niger* cultivado em hidrolisado de bagaço gasto

Quatro balões de 100-mL Erlenmeyer (nomeados A-D) foram

preenchidos com 48 mL de SBH, 1 mL de solução nutriente (25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 69 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, e 50 g/L de extrato de levedura), 0,05 mL de solução residual (0,22 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g/L H_3BO_3 , 0,05 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,017 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,016 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,015 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e 0,5 g/L EDTA) e tampados com tampas de algodão. Os balões A e B foram inoculados com 0,95 mL de esporos de *A. niger* D15[egl] (a concentração final dos esporos foi 1×10^6 esporos/mL do meio). Os balões C e D foram inoculados com esporos de *A. niger* D15[pGT] na mesma concentração. Para efeitos de comparação, quatro balões de 100-mL Erlenmeyer (nomeados E-H) fechados com tampas de algodão foram preenchidos com 49,05 mL de meio padrão (5 g/L de extrato de levedura, 0,4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L glicose, 2 g/L de ácidos casamino, 0,5 g/L KCl, 1,5 g/L KH_2PO_4 , 6 g/L NaNO_3 , e 1 mL/L de solução residual). Os balões E e F foram inoculados com 0,95 mL de esporos de *A. niger* D15[egl] e os balões G e G foram inoculados com 0,95 mL de esporos de *A. niger* D15[pGT] (a concentração final dos esporos foi 1×10^6 esporos/mL do meio). Os balões foram incubados por onze dias em uma incubadora com agitação (Incubator Shaker, modelo G25, New Brunswick Scientific) a 30°C e 150 rpm. A atividade de endoglucanase foi monitorada durante o experimento de fermentação e a produção de biomassa foi medida no fim do experimento (ver a descrição a seguir).

Medição da biomassa

Para determinar o peso seco da biomassa de *A. niger*, pedaços de Miracloth (Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA, USA) foram secados em um forno de micro-ondas por 15 minutos e foram a seguir postos em um dessecador. Após duas horas, os pedaços de Miracloth foram removidos do dessecador e pré-pesados em uma balança analítica. Os volumes das suspensões de cultura de *A. niger* dos experimentos de fermentação foram medidos e as suspensões de cultura foram então filtradas através dos Miracloth secos sob sucção. Cada pedaço de Miracloth com biomassa foi lavado com 50 mL de dH_2O , secado conforme previamente descrito e então pesado.

Ensaio de atividade enzimática e análise SDS-PAGE

A atividade de endoglucanase foi monitorada usando um método baseado no ácido dinitrosalicílico conforme descrito por Bailey et al., 1992 (Bailey, M.J. et al., J. Biotechnol. 1992, 23, pp. 257-270). O tampão usado para o ensaio foi citrato (0,05 M, pH 5,5), o substrato foi carbóxi metil celulose (Fluka de viscosidade ultra baixa, Sigma-Aldrich) (1% em tampão de citrato 0,05 M, pH 5,5) e o ensaio foi realizado a 50°C. A atividade enzimática é dada em nkat/mL (nmol de açúcares redutores produzidos/mL/s).

Sobrenadantes do experimento de fermentação foram diluídos quatro vezes com dH₂O e carregados em gel SDS-PAGE 10% para a determinação do perfil de proteínas extracelulares bem como do tamanho da proteína Cel7B. Após a eletroforese, o gel foi marcado com marcador de gel Sypro Red (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) de acordo com Steinberg et al., 1996 (Steinberg, T.H. et al., Anal. Biochem. 1996, 239, p. 238-245.). A análise do gel foi analisada com um mapeador de gel (ImageQuant 400, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). Ademais, a concentração de proteína Cel7B foi medida pela execução do gradiente de concentração de albumina do soro bovino como uma proteína padrão (Pierce, Rockford, IL, EUA) bem como os sobrenadantes de Cel7B em um gel de SDS-PAGE e comparação da intensidade das bandas marcadas com SyproRed usando o software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A concentração de proteínas Cel7B foi calculada como o valor médio de dois sobrenadantes de balões de cultura separados que foram analisados em quádruplas (ou seja, quatro géis separados). A tinta SyproRed exibe baixa variabilidade na marcação de diferentes tipos de proteínas devido a sua interação com o revestimento de sulfato de dodecila em volta da proteína em gel SDS-PAGE (Steinberg, T.H., et al., Anal. Biochem. 1996 A_239, p. 223-237). As atividades específicas relatadas são baseadas em medições de proteína Cel7B. As medições de proteína Cel7B foram feitas em amostras tomadas em um período fixo para todas as amostras em um experimento de fermentação. O período das medições foi configurado no momento em que a maior atividade de endoglucanase única foi notada durante cada experimento de fermentação.

Análise química

O conteúdo de ácido acético foi quantificado usando um sistema de cromatografia Dionex ICS-2000 equipado com um detector de condutividade. A separação foi realizada em uma coluna IonPac AS 15 (250 x 4 mm) com uma pré-coluna IonPac AG15 (50 x 4) (Dionex). A concentração total de compostos fenólicos foi determinada usando o método Folin-Ciocalteu com vanilina com o padrão. As concentrações de furfural e HMF foram determinadas por HPLC. Uma coluna Xterra MS C18 (5 µm, 2,1 x 150 mm) (Waters, Milford, MA, EUA) foi usada com um sistema em série VP Shimadzu (Shimadzu, Quioto, Japão) com detecção UV a 282 nm. A eluição foi conduzida de acordo com a descrição de Martin et al. (Martin, C. Et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 2007, 136 – 140, p. 339 – 352).

Resultados

Os conteúdos dos inibidores no pré-hidrolisado de bagaço, hidrolisado de bagaço, hidrolisado pós-fermentação com *S. Cerevisiae*, SBH e SBH pós-fermentação com *A. niger* D15[egl] são mostrados na Tabela 1.

Ficou claro que todo o ácido acético, furfural e HMF bem como cerca de 30% dos compostos fenólicos foram consumidos ou convertidos após 11 dias de fermentação, mostrado como SBHFAFA na Tabela 1. As concentrações dos inibidores ficaram mais ou menos constante antes da desintoxicação, tal qual após o pré-tratamento e a fermentação com *S. Cerevisiae*, mas diminuíram notavelmente após a desintoxicação com *A. Niger*. Assim, *A. Niger* mostrou um efeito desintoxicante surpreendentemente alto no hidrolisado de bagaço gasto, removendo quase todos os inibidores.

A atividade volumétrica, concentração de proteína Cel7B, atividade de Cel7B específica e produção de biomassa no experimento de fermentação com hidrolisado de bagaço gasto são apresentadas na Tabela 2. *A. Niger* D15[egl] cultivado em SBH alcançou concentração em biomassa de 9,8 g/L (DW). Para efeito de comparação, quando a cepa de *A. Niger* D15[egl] usada foi cultivada em meio padrão, a cepa somente atingiu uma biomassa de 3,4 g/L (DW). *A. Niger* D15[egl] cultivada em SBH rendeu uma concentração de proteína Cel7B de 0,41 mg/mL após 10 dias de fermenta-

ção, o que é quase quatro vezes mais que aquela da mesma cepa cultivada em meio padrão. Ademais, ficou claro que o SBH também serviu como um excelente meio de cultura para a cepa de *A. Niger* D15[egl] recombinante (Tabela 2). *A. Niger* D15[pGT] cultivada em SBH somente atingiu uma bio-
 5 massa de 6,8 g/L (DW). Para efeito de comparação, quando a cepa de *A. Niger* D15[pGT] foi cultivada em meio padrão, a cepa somente atingiu uma biomassa de cerca de 4,1 g/L (DW). Ademais, a fermentação com *A. niger* D15[egl] em SBH resultou em atividade de endoglucanase aumentada por dez dias e a maior atividade monitorada foi 2.100 nkat/mL (figura 3), enquanto
 10 *A. niger* D15[pGT], sem o gene para a produção de endoglucanase, não deu origem a qualquer atividade de endoglucanase quando cultivado em SBH.

Este experimento mostrou que *A. niger* tanto possui a capacidade de desintoxicar o hidrolisado de bagaço gasto quanto de crescer muito bem no ambiente do hidrolisado, atingindo uma produção de biomassa ainda
 15 maior se comparado com o crescimento em meio padrão. Ademais, uma alta quantidade de enzimas e alta atividade de enzimas foram encontradas quando usando a cepa de *A. niger* recombinante capaz de produzir endoglucanase. A quantidade de enzimas produzidas foi ainda mais alta que quando cultivadas em meio padrão. Consequentemente, este exemplo demonstrou
 20 que o fungo filamentoso *A. niger* é adequado para uso como biocatalisador de desintoxicação na produção de etanol, já que ele pode tanto desintoxicar o hidrolisado gasto quanto, ao mesmo tempo, produzir enzimas.

Tabela 1

	Ácido acético	Compostos fenólicos	Furfural	HMF
BPH	0,8	1,1	0,2	0,03
BH	0,8	0,9	0,1	0,02
BHAFA ^a	0,9	0,9	< 0,01	<0,02
SBH ^b	0,9	1	< 0,01	0,02
SBHAFA ^c	0	0,7	0	0

A Tabela 1 mostra a concentração de inibidores (g/L) em etapas

diferentes do processo de desintoxicação do hidrolisado de bagaço gasto. Os códigos usados na Tabela 1 representam o hidrolisado em diferentes etapas: BPH = pré-hidrolisado de bagaço, BH = hidrolisado de bagaço, BHAFS = hidrolisado de bagaço após a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, SBH = hidrolisado de bagaço gasto, SBHAFA = hidrolisado de bagaço gasto após onze dias de fermentação com *A. niger* D15[egl]. ^aO hidrolisado foi diluído cerca de 5% se comparado a BH. ^bO hidrolisado foi concentrado < 2% se comparado a BHAFS. ^cO hidrolisado foi diluído cerca de 4% se comparado a SBH. Desvios padrões relativos da análise: ácido acético, < 10%; compostos fenólicos, < 12%; furfural e HMF, < 5%.

Tabela 2

Cepa de <i>A. niger</i> e meio de cultura	Atividade de endoglucanase (nkat/mL) ^a	Concentração da proteína Cel7B (mg/mL) ^b	Atividade de endoglucanase / proteína Cel7B (nkat/mg)	Biomassa (DW g/L) ^c
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SBH	2.100 ± 130	0,41 ± 0,06	5100	9,8 ± 1,6
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SBH	0	ND	-	6,8 ± 1,1
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM	480 ± 22	0,11 ± 0,02	4400	3,4 ± 0,3
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM	0	ND	-	4,1 ± 0,5

A Tabela 2 mostra a atividade volumétrica, a concentração de proteína Cel7B, a atividade de Cel7B específica e a produção de biomassa para *A. niger* cultivada em hidrolisado de bagaço gasto e em meio padrão. Os códigos usados na Tabela 2 representam o seguinte: SBH = hidrolisado de bagaço gasto, SM = meio padrão, ND = não detectável. ^aA atividade de endoglucanase é calculada como o valor médio das medições de atividade de duas culturas separadas após dez dias de fermentação. ^bA concentração de proteína é calculada como o valor médio de dois sobrenadantes de ba-

lões de fermentação distintos repetidamente analisados em 4 géis SDS após dez dias de fermentação. ^cA biomassa é calculada como o valor médio de duas culturas separadas feitas depois de 11 dias de cultivo.

Exemplo 2. Desintoxicação de hidrolisado de abeto gasto usando *Aspergillus*

5 *niger*

Preparação do hidrolisado de abeto

Um hidrolisado de abeto foi produzido por hidrólise em ácido diluído em duas etapas conforme descrito em Alriksson et al., 2006 (Alriksson, B., et al. Appl. Biochem. Biotechnol. 2006, 129-132, pp. 599-611).

10 Fermentação com *S. cerevisiae*

A fermentação do hidrolisado de abeto foi realizada como ocorreu com o hidrolisado de bagaço descrito no Exemplo 1, mas os balões com o hidrolisado de abeto receberam inoculação de levedura de 9 g/L (DW) devido à maior toxicidade do hidrolisado de abeto.

15 Destilação

A destilação foi realizada conforme descrito para o hidrolisado de bagaço no Exemplo 1 para fornecer hidrolisado de abeto gasto (SS), o qual foi coletado e armazenado a 4°C até uso posterior.

Cepa recombinante de *A. niger*

20 A cepa de *A. niger* D15[egl] descrita no Exemplo 1 foi usada para a desintoxicação do hidrolisado de abeto gasto.

Experimento de desintoxicação com *A. niger* cultivada em hidrolisado de abeto gasto

25 Quatro balões de 100 mL Erlenmeyer (nomeados A – D) foram enchidos com 48 mL de SSH e a fermentação foi realizada conforme descrito no experimento de fermentação do Exemplo 1. Ademais, medições de biomassa, ensaio de atividade enzimática e análise SDS-PAGE bem como a análise química foram realizados conforme descrito no Exemplo 1.

Resultados

30 O conteúdo inibidor no hidrolisado de abeto, no hidrolisado de abeto após a fermentação com *S. Cerevisiae*, no SSH e SSH após a fermentação com *A. niger* D15[egl] são mostrados na Tabela 3. Ficou claro que es-

sencialmente todo o ácido acético, HMF e cerca de 30% dos compostos fenólicos foram consumidos ou convertidos após nove dias de fermentação, conforme visto em SSHAFA na Tabela 3. Assim, de modo similar ao que foi encontrado para o hidrolisado de bagaço gasto, *A. niger* teve um efeito de-
 5 sintoxicante surpreendentemente alto no hidrolisado de abeto gasto, removendo quase todos os inibidores.

A atividade volumétrica, concentração de proteína Cel7B, atividade de Cel7b específica e produção de biomassa na fermentação são apresentadas na Tabela 4. O SSH atingiu concentrações de biomassa de 4,5
 10 g/L (DW), o qual foi mais alto que quando cultivado em meio padrão. Ademais, a concentração de proteína Cel7B foi de 0,10 mg/mL para a fermentação em SSH, o qual foi similar à concentração encontrada quando cultivado em meio padrão, enquanto a atividade atingiu 820 nkat/mL, maior se comparada ao cultivo em meio padrão.

De modo similar ao que foi encontrado no Exemplo 1, este experimento claramente mostra que *A. niger* possui a capacidade de desintoxicar hidrolisado de abeto gasto e crescer extremamente bem no ambiente do hidrolisado. Ademais, uma alta quantidade de enzimas e alta atividade de enzimas foram encontradas quando usando a cepa de *A. niger* recombinante
 20 capaz de produzir endoglucanase. Consequentemente, este exemplo demonstrou que o fungo filamentoso *A. niger* é adequado para uso como biocatalisador de desintoxicação na produção de etanol.

Tabela 3

	Ácido acético	Compostos fenólicos	Furfural	HMF
SPH	2,8	2,8	0,7	2,2
SHAFS ^a	3	2,8	0	0,9
SSH ^b	3	2,9	0	0,8
SSHAFA ^c	0,1	2	0	0,04

A tabela 3 mostra a concentração de inibidores (g/L) em etapas
 25 diferentes do processo de desintoxicação do hidrolisado de abeto gasto. Os códigos usados na Tabela 3 representam as diferentes etapas do processo

de desintoxicação do hidrolisado de abeto gasto: SH = hidrolisado de abeto, SHAFS = hidrolisado de abeto após a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, SSH = hidrolisado de abeto gasto, SSHAFA = hidrolisado de abeto gasto após nove dias de fermentação com *A. niger* D15[egl]. ^aO hidrolisado foi diluído cerca de 5% se comparado a SH. ^bO hidrolisado foi concentrado < 2% se comparado a SHAFS. ^cO hidrolisado foi diluído cerca de 4% se comparado a SSH. Desvios padrões relativos da análise: ácido acético, < 10%; compostos fenólicos, < 12%; furfural e HMF, < 5%.

Tabela 4

Cepa de <i>A. niger</i> e meio de cultura	Atividade de endoglucanase (nkat/mL) ^a	Concentração da proteína Cel7B (mg/mL) ^b	Atividade de endoglucanase / proteína Cel7B (nkat/mg)	Biomassa (DW g/L) ^c
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SSH	820 ± 51	0,1 ± 0,01	7500	4,5 ± 0,0
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM	550 ± 52	0,11 ± 0,00	5000	3,2 ± 0,1

A Tabela 4 mostra a atividade volumétrica, a concentração de proteína Cel7B, a atividade de Cel7B específica e a produção de biomassa para *A. niger* cultivada em hidrolisado de abeto gasto e em meio padrão. Os códigos usados na Tabela 4 representam o seguinte: SSH = hidrolisado de abeto gasto, SM = meio padrão, ND = não detectável. ^aA atividade de endoglucanase é calculada como o valor médio das medições de atividade de duas culturas separadas após dez dias de fermentação. ^bA concentração de proteína é calculada como o valor médio de dois sobrenadantes de balões de fermentação distintos repetidamente analisados em 4 géis SDS após nove dias de fermentação. ^cA biomassa é calculada como o valor médio de duas culturas separadas feitas depois de dez dias de cultivo.

Exemplo 3. Remoção dos inibidores do meio padrão usando *Aspergillus niger*

Experimento de fermentação com *A. niger* cultivado em meio

padrão com inibidores

Um experimento adicional foi projetado para estudar o metabolismo de *A. niger* D15[egl] de compostos não açúcares em hidrolisados de lignocelulose. Dezoito balões de 100 mL Erlenmeyer foram enchidos com 48 mL de meio padrão, 1 mL de solução inibidora e 1 mL de inoculação de esporos (ou 1 mL de H₂O estéril para os balões de controle). Os balões foram divididos em seis grupos (três balões por grupo). Cada grupo possuía a adição de uma solução de inibidores diferente. Compostos típicos encontrados em hidrolisados de lignocelulose representando as três principais categorias de inibidores ácidos alifáticos, furanaldeídos e compostos fenólicos foram escolhidos para o experimento. O grupo 1 (balões 1A-C) possuía uma adição de 5 g/L de ácido acético, o grupo 2 (balões 2A – C) possuía uma adição de 1 g/L de furfurak, o grupo 3 (balões 3A – C) possuía uma adição de 2 g/L de 5-hidróxi-metil-furfural (HMF), o grupo 4 (balões 4A – C) possuía uma adição de 0,5 g/L de vanilina, o grupo 5 (balões 5A – C) possuía uma adição de 0,2 g/L de coniferil aldeído e ao grupo 6 (balões 6A – C) nenhum inibidor foi adicionado mas sim 1 mL de H₂O estéril para equalizar o volume. O pH de todos os balões foi ajustado para 6,3 com NaOH. Todos os balões A e B foram inoculados com *A. niger* D15[egl] (1×10^6 esporos/mL do meio), enquanto os balões C (ou seja, os balões de controle) foram usados para investigar se as concentrações dos inibidores eram afetadas na ausência de células de *A. niger* (por exemplo, por degradação ou evaporação). Todos os 18 balões foram incubados por nove dias em uma incubadora com agitação a 150 rpm e 30°C. A atividade de endoglucanase foi monitorada durante o experimento e a biomassa foi medida no fim do cultivo conforme descrito nos Exemplos 1 e 2. As concentrações de vanilina e coniferil aldeído foram medidas via HPLC. A coluna Xterra MS C18 foi usada no sistema em série VP Shimadzu com detecção UV a 254 nm. A eluição foi realizada a uma taxa de escoamento de 0,4 mL/min com um gradiente feito de água Milli-Q e acetonitrila, ambos contendo 3 mM de ácido fórmico. O projeto do gradiente consistia em quatro etapas com um tempo total de 40 min: (i) 25% de acetonitrila foram aplicados por 6 minutos, (ii) a concentração de acetonitrila foi aumen-

tada linearmente até 85% durante 4 minutos, (iii) 85% de acetonitrila foram aplicadas por 12 minutos, (iv) a concentração de acetonitrila foi instantaneamente reduzida para 25% e aplicada por 18 minutos.

Resultados

5 *A. niger* D15[egl] cresceu bem em todos os meios padrões contendo inibidores exceto o que possuía adição de furfural, no qual uma fase de atraso no crescimento e na atividade enzimática foi observada (figura 4). Toda a vanilina, ácido acético, coniferil aldeído, HMF e furfural foram consumidos ou convertidos nos nove dias de fermentação. A fermentação no meio com a adição de ácido acético mostrou a maior atividade de endoglucanase 10 e atingiu 1200 nkat/mL após sete dias, enquanto a atividade do cultivo de referência no meio sem inibidores atingiu 590 nkat/mL (dia 7) (Tabela 5). As fermentações com a adição de vanilina e coniferil aldeído também mostraram atividade enzimática maior ou ligeiramente maior que a referência, enquanto 15 as fermentações contendo HMF e furfural exibiram atividade enzimática menor durante quase todo o experimento de fermentação. A fermentação na presença de ácido acético mostrou a maior atividade específica e chegou a 12.000 nkat/mg, o que é cerca de duas vezes mais alta que aquela da fermentação de referência e cerca de quatro vezes mais alta que a fermentação 20 na presença de furfural. A concentração de biomassa mais alta foi observada para o cultivo onde HMF foi adicionado (5,2 g/L (DW)), enquanto o cultivo com ácido acético adicionado teve a menor formação de biomassa (2,9 g/L (DW)). A fermentação de referência teve uma biomassa de 4,4 g/L (DW). A produção de proteína Cel7B ficou na faixa de 0,10 a 0,15 mg/mL 25 para todas as fermentações.

Assim, este experimento demonstra ainda mais a capacidade inesperada de *A. niger* de usar substâncias inibidoras comuns encontradas em hidrolisados para crescer. Este experimento também mostrou que *A. niger* é capaz de produzir enzimas em altas concentrações e de alta atividade 30 quando cultivado em meio que compreende substâncias inibidoras, fazendo do *A. niger* adequado como biocatalisador de desintoxicação, por exemplo, quando produzindo etanol.

Tabela 5

Cepa de <i>A. niger</i> e meio de cultura	Atividade de endoglucanase (nkat/mL) ^a	Concentração da proteína Cel7B (mg/mL) ^b	Atividade de en- doglucanase / proteína Cel7B (nkat/mg)	Biomassa (DW g/L) ^c
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM	550 ± 52	0,11 ± 0	5000	3,2 ± 0,1
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM + ácido acético	1200 ± 43	0,1 ± 0,01	12000	2,9 ± 0,4
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM + furfural	340 ± 33	0,12 ± 0,00	2800	3,5 ± 0,0
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM + HMF	500 ± 20	0,11 ± 0,00	4500	5,2 ± 0,3
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM + vanilina	840 ± 79	0,15 ± 0,00	5600	4,0 ± 0,1
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM + coniferil aldeído	670 ± 2	0,13 ± 0,00	5200	4,1 ± 0,1
<i>A. niger</i> D15[egl] cultivada em SM	590 ± 4	0,11 ± 0,01	5400	4,4 ± 0,3

A Tabela 5 mostra a atividade volumétrica, a concentração de proteína Cel7B, a atividade de Cel7B específica e a produção de biomassa para *A. niger* cultivada em meio padrão compreendendo diversos inibidores.

- 5 Os resultados são mostrados. Os códigos usados na Tabela 5 representam o seguinte: SM = meio padrão, HMF = 5-hidróxi-metil-furfural. ^aA atividade de endoglucanase é calculada como o valor médio das medições de atividade

de duas culturas separadas após sete dias de fermentação. ^bA concentração de proteína é calculada como o valor médio de dois sobrenadantes de balões de fermentação distintos repetidamente analisados em 4 géis SDS após sete dias de fermentação. ^cA biomassa é calculada como o valor médio de
 5 duas culturas separadas feitas depois de nove dias de cultivo.

Exemplo 4: Recirculação da água de processo após desintoxicação do hidrolisado gasto usando *Aspergillus niger*

O hidrolisado gasto de bagaço e de abeto é preparado conforme mostrado no Exemplo 1 e Exemplo 2. A desintoxicação é realizada submetendo o hidrolisado gasto a uma cepa do tipo selvagem de *A. niger*, sob condições descritas nos Exemplos 1 e 2. após 11 dias de incubação com *A. niger*, o hidrolisado desintoxicado é filtrado de modo que a biomassa de *A. niger* é separada do hidrolisado desintoxicado. A água de processo purificada é então recirculada em processos adicionais quando da preparação do
 15 hidrolisado de abeto e bagaço gasto. Como exemplo, uma parte da água de processo purificada é misturada com água fresca e usada para diluir o ácido sulfúrico usado no pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar, conforme descrito no Exemplo 1, outra parte da água de processo purificada é misturada com água fresca e usada para preparar a solução de NaOH usada na
 20 hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar conforme descrito no Exemplo 1 ou usada na hidrólise em ácido em duas etapas quando da preparação de hidrolisado de abeto, conforme descrito no Exemplo 2, e ainda uma outra parte da água de processo é misturada com água fresca e usada para preparar a solução nutriente usada no hidrolisado de abeto ou bagaço gasto com *S. Cerevisiae* descrito no Exemplo 1. Este processo é ilustrado esquematicamente na figura 1.

Exemplo 5. Recirculação da água de processo e enzimas de sacarificação produzidas após a desintoxicação do hidrolisado gasto usando *Aspergillus niger*

30 O hidrolisado gasto de bagaço e abeto é preparado conforme descrito no Exemplo 1 e Exemplo 2. A desintoxicação é realizada submetendo o hidrolisado gasto a uma cepa de *A. niger* recombinante que expressa

uma enzima de sacarificação sob as condições descritas no Exemplo 1 e Exemplo 2. A água de processo purificada é recirculada em processos adicionais quando da preparação do hidrolisado de bagaço gasto e abeto conforme descrito no Exemplo 4. As enzimas de sacarificação produzidas são

5 concentradas e então armazenadas para uso posterior, ou adicionadas em hidrólises adicionais de pré-hidrolisados de bagaço. Como exemplo, as enzimas de sacarificação produzidas são misturadas com as celulasas e celobiasas descritas no Exemplo 1 acima, e adicionadas ao pré-hidrolisado de abeto ou bagaço. Este processo é esquematicamente ilustrado na figura 2.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparação de um produto químico-alvo derivável da biomassa celulósica envolvendo a desintoxicação do hidrolisado gas-
to, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- 5 (a) fornecer biomassa celulósica;
- (b) submeter a biomassa celulósica a pelo menos um fluido a-
quoso de pré-tratamento de modo a fornecer biomassa celulósica pré-
tratada;
- (c) submeter a biomassa celulósica pré-tratada a pelo menos um
- 10 líquido aquoso hidrolisante, opcionalmente contendo enzimas de sacarifica-
ção, sob condições em que pelo menos parte da biomassa celulósica pré-
tratada é hidrolisada em um hidrolisado celulósico, tal hidrolisado celulósico
compreendendo açúcares fermentáveis e substâncias inibidoras;
- (d) submeter os açúcares fermentáveis à fermentação em um lí-
15 quido aquoso, a fermentação usando pelo menos um biocatalisador de fer-
mentação sob condições em que pelo menos uma parte dos açúcares fer-
mentáveis são fermentados em um produto químico-alvo primário;
- (e) separar o produto químico-alvo primário do hidrolisado fer-
mentado para fornecer um hidrolisado gasto compreendendo substâncias
- 20 inibidoras;
- (f) desintoxicar o hidrolisado gasto pela diminuição da concen-
tração de pelo menos uma das substâncias inibidoras usando um biocatali-
sador de desintoxicação selecionado do grupo que consiste em fungos fila-
mentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem, de modo a forne-
25 cer um hidrolisado gasto desintoxicado;
- (g) recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desin-
toxicado, opcionalmente após purificação adicional, como parte de um líqui-
do aquoso fornecido em pelo menos uma das etapas (b), (c) e (d).
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
- 30 fato de que o biocatalisador de fermentação da etapa (d) é levedura, e o
produto químico-alvo primário da etapa (d) é o etanol.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado

pelo fato de que a biomassa celulósica da etapa (a) é selecionada dentre material de madeira, papel rejeitado, resíduos de agricultura, como o bagaço e safras energéticas.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o biocatalisador de desintoxicação produz enzimas durante a desintoxicação na etapa (f).

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que as enzimas são enzimas de sacarificação.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que as enzimas de sacarificação obtidas na etapa (f) são adicionadas ao líquido hidrolisante aquoso na etapa (c).

7. Sistema para produção de pelo menos um produto químico-alvo derivável de biomassa celulósica, compreendendo:

(a) pelo menos um recipiente de pré-tratamento de biomassa celulósica para pré-tratamento de pelo menos uma parte da biomassa celulósica fornecida para biomassa celulósica pré-tratada, conectado a

(b) um recipiente de hidrólise para hidrolisar pelo menos uma parte da biomassa celulósica pré-tratada para hidrolisado celulósico, tal hidrolisado celulósico compreendendo açúcares fermentáveis e substâncias inibidoras, ainda conectado a

(c) um recipiente de fermentação compreendendo um biocatalisador de fermentação para fermentar pelo menos uma parte dos açúcares fermentáveis, fornecendo um hidrolisado fermentado que compreende o produto químico-alvo primário e substâncias inibidoras, ainda conectado a

(d) um primeiro meio de separação, para separar o produto químico-alvo primário do hidrolisado fermentado e para fornecer um hidrolisado gasto, ainda conectado a

(e) um recipiente de desintoxicação, compreendendo um biocatalisador de desintoxicação selecionado do grupo que consiste em um fungo filamentoso recombinante, mutante ou do tipo selvagem para desintoxicar o hidrolisado gasto de pelo menos uma substância inibidora e para fornecer um hidrolisado gasto desintoxicado, ainda conectado a

(f) meios de recirculação para recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado para pelo menos um do pelo menos um recipiente de pré-tratamento de (a), recipiente de hidrólise de (b) e recipiente de fermentação de (c),

5 em que o recipiente de hidrólise e o recipiente de fermentação podem ser o mesmo recipiente ou dois recipientes diferentes.

8. Uso de um fungo filamentoso recombinante, mutante ou do tipo selvagem, caracterizado pelo fato de ser para desintoxicar o hidrolisado celulósico gasto.

10 9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o fungo filamentoso é *Aspergillus niger* ou *Hypocrea jecorina* recombinante, mutante ou do tipo selvagem para desintoxicar o hidrolisado celulósico gasto.

15 10. Uso, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que a desintoxicação envolve a remoção de pelo menos uma substância inibidora selecionada do grupo que consiste em furanos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos.

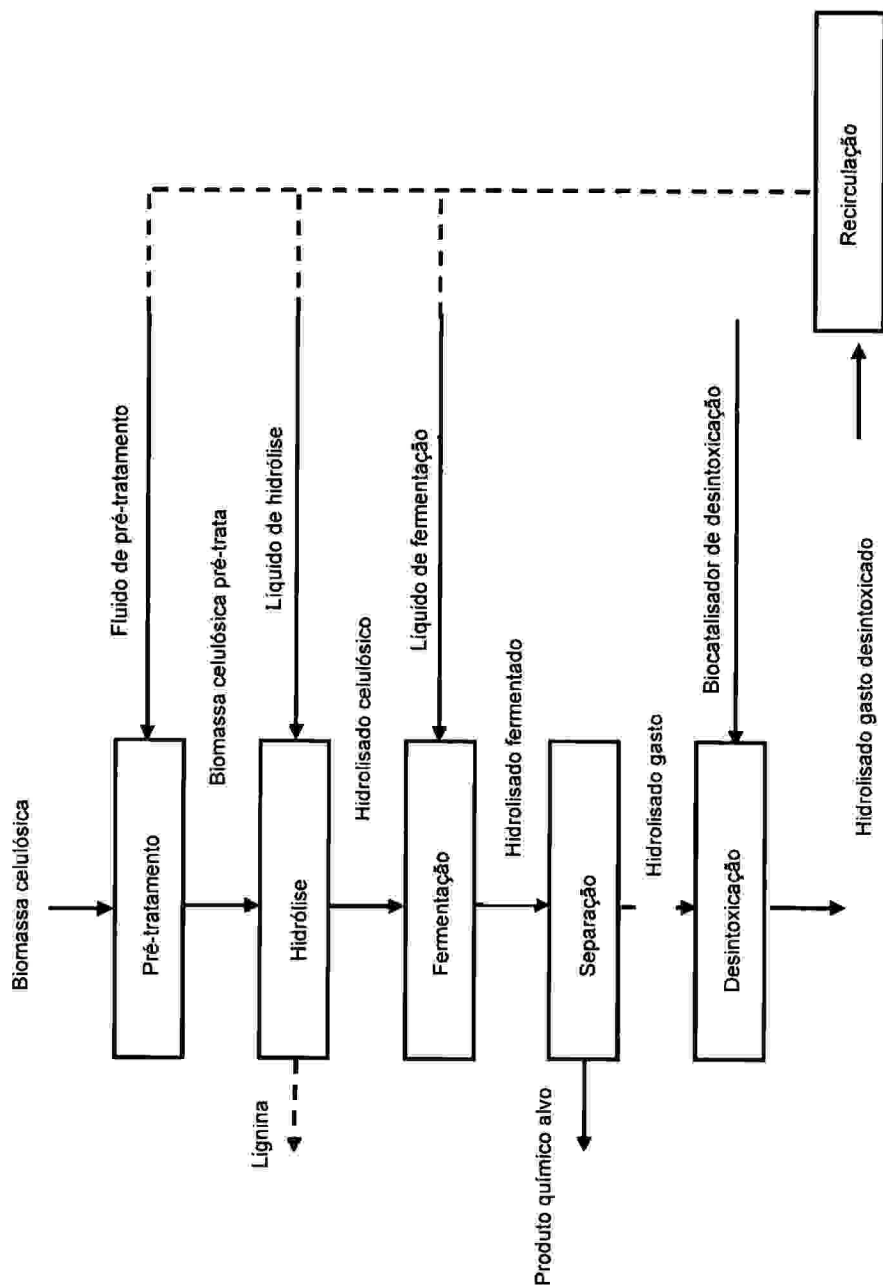


FIG. 1

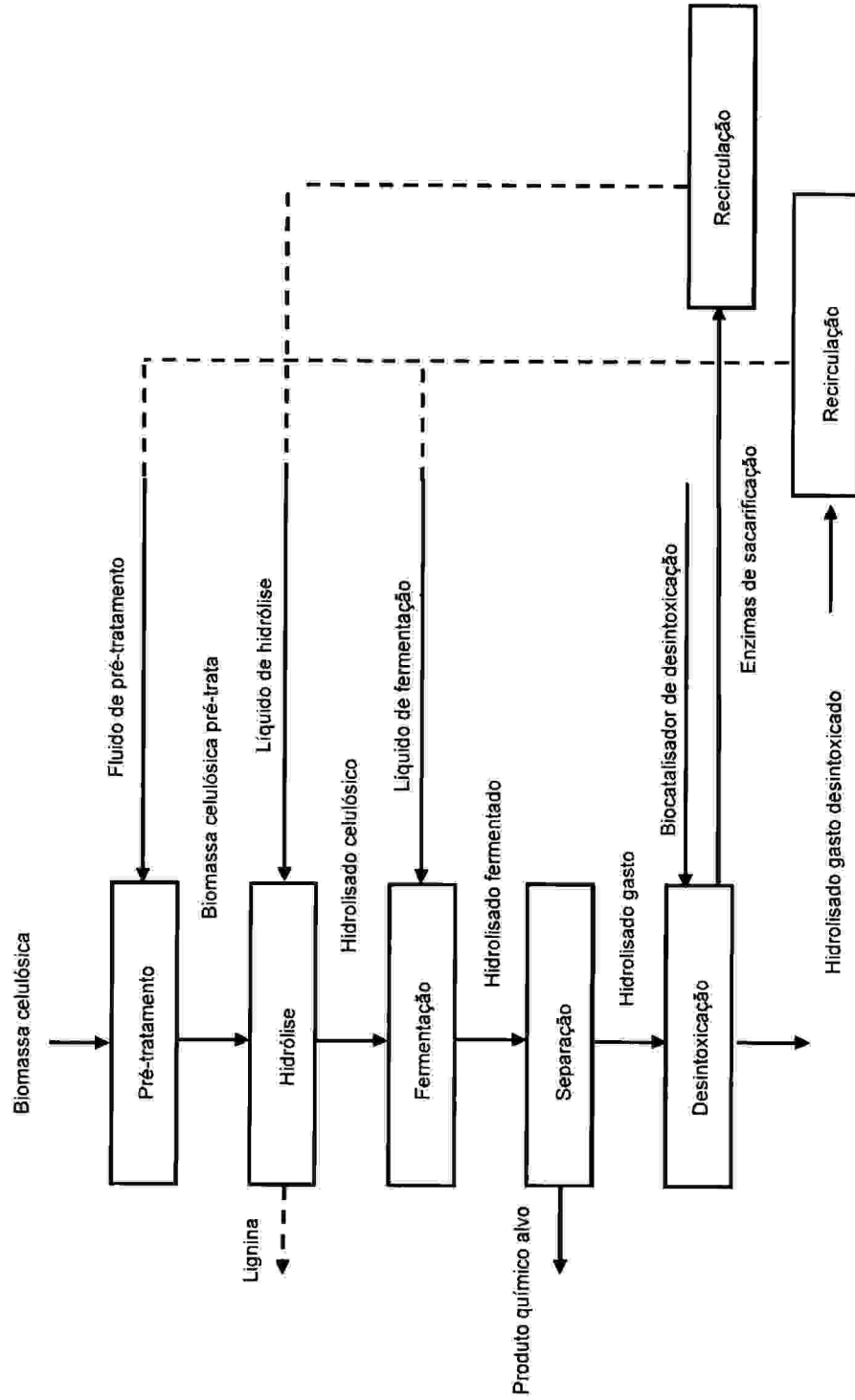


FIG. 2

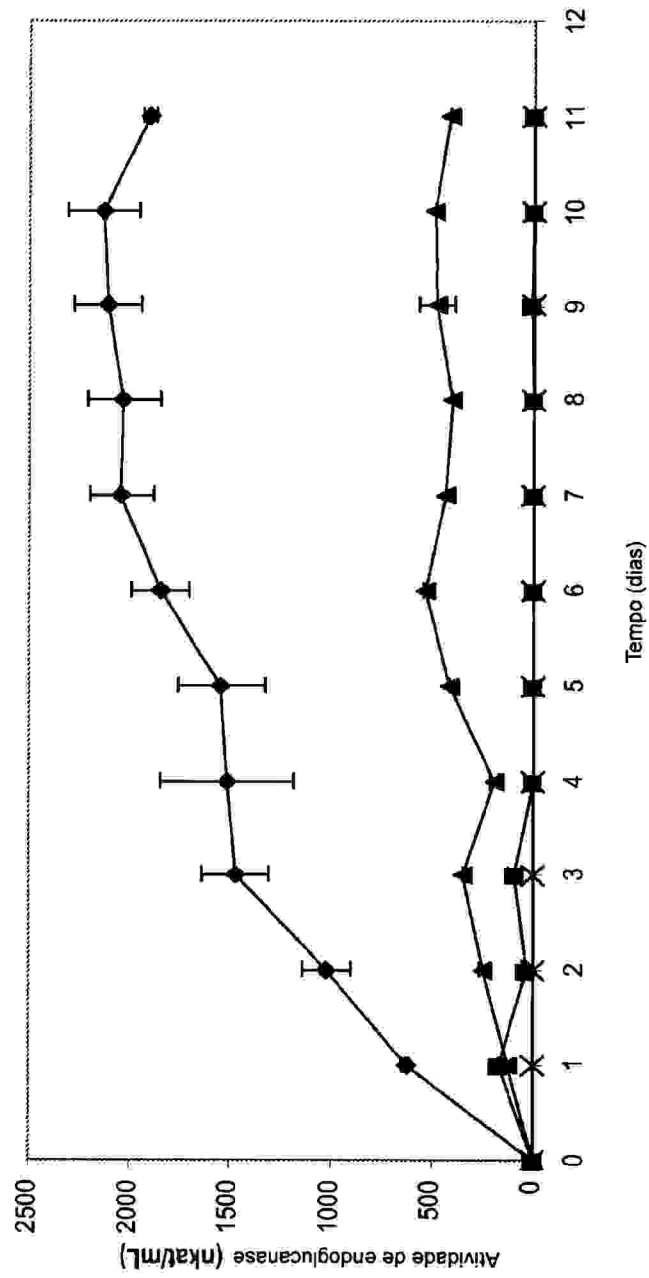


FIG. 3

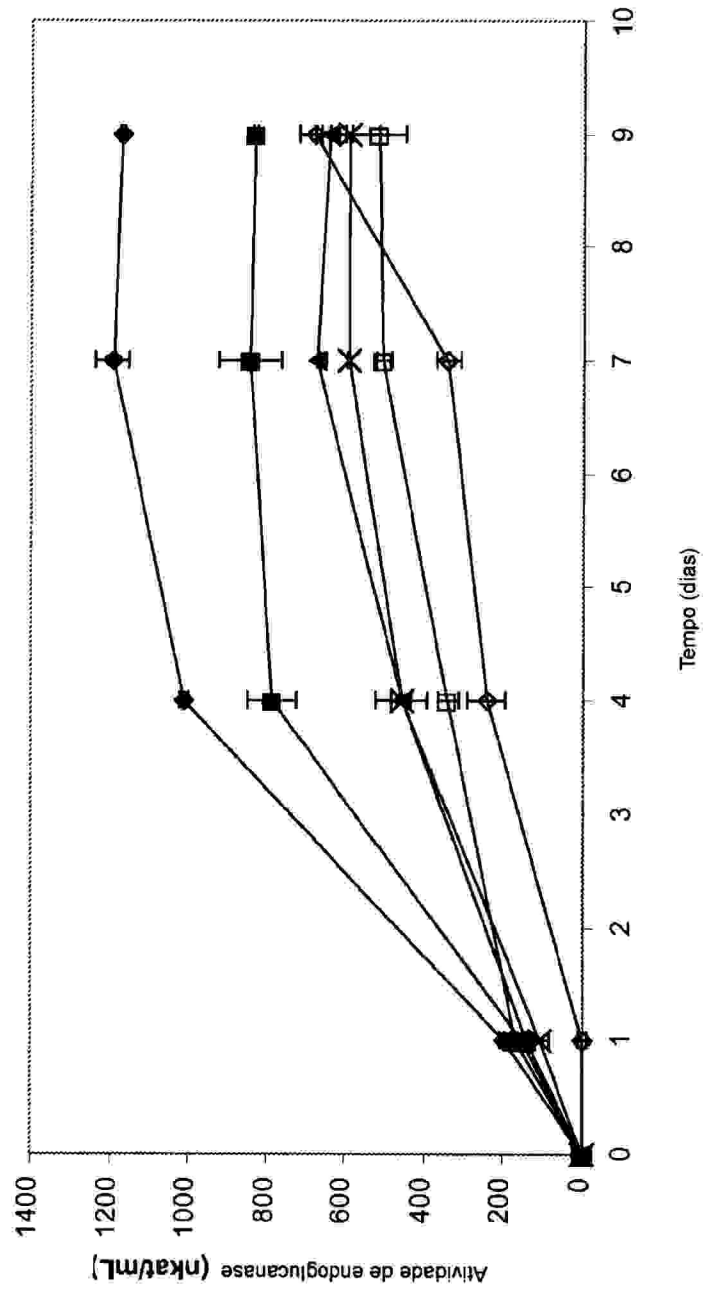


FIG. 4

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO QUÍMICO-ALVO DERIVÁVEL DA BIOMASSA CELULÓSICA, SISTEMA PARA PRODUÇÃO DO DITO PRODUTO, E USO DE UM FUNGO FILAMENTOSO RECOMBINANTE, MUTANTE OU DO TIPO SELVAGEM".**

A presente invenção refere-se a um método para a preparação de um produto químico-alvo derivável da biomassa celulósica, envolvendo a desintoxicação do hidrolisado gasto. O método compreende as etapas de fornecer biomassa celulósica, submeter a biomassa celulósica a pré-tratamento aquoso, hidrólise aquosa e fermentação sob condições em que pelo menos uma parte dos açúcares fermentáveis é fermentada em um produto químico-alvo primário, separar o produto químico-alvo primário do hidrolisado fermentado para fornecer um hidrolisado gasto que compreende substâncias inibidoras e desintoxicar o hidrolisado gasto pela diminuição da concentração de pelo menos uma das substâncias inibidoras, usando um biocatalisador de desintoxicação selecionado do grupo que consiste em fungos filamentosos recombinantes, mutantes ou do tipo selvagem e recircular pelo menos uma parte do hidrolisado gasto desintoxicado, opcionalmente após purificação adicional.