



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº BR 102012032972-7

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

**(21) Número do Depósito:** BR 102012032972-7

**(22) Data do Depósito:** 21/12/2012

**(43) Data da Publicação Nacional:** 14/07/2015

**(51) Classificação Internacional:** C12N 9/42; C12R 1/80.

**(54) Título:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASE E HEMICELULASES EMPREGANDO CELULOSE PARCIALMENTE HIDROLISADA, USO DE CELULOSE PARCIALMENTE HIDROLISADA, E, SUBSTRATO COMPREENDENDO CELULOSE PARCIALMENTE HIDROLISADA

**(73) Titular:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL - UCS. CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Cidade Universitária, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95.020-972; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. CGC/CPF: 63025530000104. Endereço: Rua da Reitoria, 109 - Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, BRASIL(BR), 05508-900

**(72) Inventor:** ALDO JOSÉ PINHEIRO DILLON; FÁTIMA GRASIELA POZZAN; LUISA CZAMANSKI NORA; MARCOS SILVEIRA BUCKERIDGE; AUGUSTO CESAR CRIVELLARI; MARLI CAMASSOLA.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 21/12/2012, observadas as condições legais

**Expedida em:** 06/04/2021

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**Relatório Descritivo de Patente de Invenção****PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES  
EMPREGANDO CELULOSE PARCIALMENTE HIDROLISADA, USO DE  
CELULOSE PARCIALMENTE HIDROLISADA, E, SUBSTRATO  
5 COMPREENDENDO CELULOSE PARCIALMENTE HIDROLISADA****Campo da Invenção**

A presente invenção se refere a um processo de produção de enzimas, especialmente celulasas e/ou hemicelulasas, utilizando como substrato  
10 celulose parcialmente hidrolisada como fonte indutora e de carbono. Em uma realização preferencial, os indutores liberados da hidrólise parcial da celulose são adicionados ao meio de cultivo para obter maiores produções de enzimas e em outra realização, a celulose parcialmente hidrolisada é acrescida ao meio de cultivo. A presente invenção se situa no campo da biologia, química e  
15 bioquímica.

**Antecedentes da Invenção**

As celulasas são constituídas por um complexo enzimático constituído por 1) endo- $\beta$ -1,4-glicanases que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso  
20 na fibra de celulose; 2) exo-  $\beta$ -1,4-glicanases ou celobiohidrolases, que agem nas extremidades redutoras e não redutoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases liberando oligossacarídeos e celobiose; e 3)  $\beta$ -1,4-glicosidases que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose a glicose.

A hidrólise de celulose a glicose tem cada vez mais importância, pois  
25 este açúcar pode ser utilizado como matéria-prima em uma série de processos biotecnológicos e químicos. Nas últimas décadas, as tecnologias baseadas na atividade de celulasas vêm despertando cada vez mais interesse. A investigação para encontrar substratos adequados para produção de biocombustíveis tais como etanol de segunda geração tem sido de particular  
30 interesse. Além disso, a celulose é encontrada em substratos de baixo custo, tais como bagaços, serragens, resíduos da agricultura e no lixo urbano. No

entanto, para que a celulose seja hidrolisada faz-se necessário o uso de enzimas (celulases) ou ácidos. A opção enzimática é mais promissora devido ao fato desta gerar menores quantidades de produtos de degradação, além das enzimas não serem corrosivas.

5           No processo de produção de celulases, a celulose é adicionada ao meio de cultivo para servir como fonte indutora. No entanto, devido ao grande tamanho das fibras de celulose, as quais são constituídas por 8.000 a 12.000 unidades glicopiranosídicas, estas moléculas não são capazes de entrar no interior da célula e acionar o mecanismo de regulação gênica que controla a  
10 produção das enzimas do complexo celulases. Assim, celulases constitutivas presentes na parede celular do conídio ou da parede celular, realizam uma hidrólise parcial da fibra de celulose, liberando assim dissacarídeos e monossacarídeos que são capazes de entrar na célula e acionar o mecanismo de produção de celulases. Intracelularmente, monossacarídeos, como a glicose  
15 também podem ser convertidos a dissacarídeos por ação de  $\beta$ -glicosidases.

No entanto, estes dissacarídeos gerados por hidrólise do substrato ou transglicosilação são gerados em pequenas quantidades, o que resulta em produção de enzimas para a manutenção da célula, não incrementando a produção de celulases como se deseja para tornar o processo de produção de  
20 celulases rentável economicamente. Neste sentido, uma alternativa é a suplementação do meio de cultivo com estes dissacarídeos. Porém, o uso destes açúcares para produção comercial de celulases torna-se inviável devido aos seus elevados valores, 100 mg de sofrorose custam R\$ 8.410,00 (oito mil quatrocentos e dez reais) enquanto a gentiobiose custa R\$ 1.334,00 (um mil  
25 trezentos e trinta e quatro reais) por grama.

Assim, como para a produção de enzimas celulases o substrato utilizado é uma forma microcristalina da celulose um produto comercial oriundo da indústria papelreira, o qual apresenta custo em torno de US\$ 130/tonelada.

A literatura patentária contempla diversos documentos relacionados à  
30 produção de celulases e em alguns casos menciona o emprego dos dissacarídeos gentiobiose, sofrorose e lactose, no entanto não há relato de

emprego de celulose parcialmente hidrolisada como fonte de indutores, conforme apresentado na presente invenção.

O documento US 2011/0262997, depositada pela Novozymes North America, Inc. relata um processo de produção de celulase em célula hospedeira e emprega material lignocelulósico pré-tratado para induzir a produção de celulase. A invenção também se relaciona com a utilização de pré-tratado com o material ligno-celulósico como indutor ou fonte de carbono nos processos de produção de celulase.

O documento intitulado "Expression systems for commercial production of cellulase and xylanase in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*", US 5,888,800 descreve o aumento da produção de uma celulase heteróloga conseguido através da transformação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* com construções genéticas que contêm um promotor de protease e da sequência de sinal para expressar genes de celulase alcalofílicas.

O pedido de patente US 2008/0241885 relata a produção de celulases empregando uma cultura microbiana que produz soforolipídio e a utilização do soforolipídio para a produção de celulases.

O documento intitulado "Method for cellulase production", US 8,093,019, depositado pela Iogen Energy Corporation descreve um processo de fermentação usando hemicelulose para produção de misturas de celulase com uma elevada proporção de celulases em relação a hemicelulases. As celulases produzidas pelo processo da invenção são ainda caracterizadas por uma produtividade específica elevada. As misturas resultantes de celulase compreendem pelo menos duas vezes mais do que a celulase, hemicelulase e são úteis para a hidrólise de substrato celulósico, em particular, do substrato pré-tratado lignocelulósico.

A patente US 4,275,163 "Cellulase-producing microorganism" descreve um processo e um microrganismo para a síntese de celulases. O microrganismo empregado é uma estirpe mutante de um fungo ascomiceto capaz de sintetizar celulases. A síntese de celulases pelo mutante não é reprimida por glicerol, reprimido pela glicose e indutíveis na presença de níveis

elevados por lactose. Além disso, a combinação de lactose com xilose elicia síntese de celulasas pelo mutante.

O documento US 2010/0009408 "Induction of Gene Expression Using a High Concentration Sugar Mixture", descreve uma composição útil para induzir a expressão de genes cuja expressão está sob controle de uma sequência de promotor indutível e métodos para a preparação composições e utilização. Neste documento são empregados os açúcares celobiose, gentiobiose, soforose e glicose para induzir a produção de celulasas.

No documento patentário "Compositions and Methods for Improved Protein Production" US 2010/0279346, são utilizados como indutores para produção de celulasas os substratos celulose, lactose, soforose e glicose/soforose.

A patente depositada sob número US 8,044,192 intitulada "Promoters and uses thereof" da Rohm Enzyme GmbH, emprega vetores contendo promotores que são ativados por soforose. Estes vetores são inseridos na célula hospedeira por transformação.

A invenção relatada na patente "Method for production of secreted proteins in fungi", US 2004/0115790, refere-se a um promotor em hospedeiro fúngico para a produção de proteínas. De acordo com a invenção, o promotor foi modificado na sua resposta aos mecanismos que medeiam transcricional da regulação negativa de proteínas secretadas sob *stress*. Esta invenção relaciona-se também a métodos para a produção de proteína otimizado de proteínas secretáveis em fungos.

A existência de diversas patentes sobre a produção de celulasas e hemicelulasas, sendo que algumas depositadas por empresas produtoras de enzimas, como Novozymes e Iogen Energy Corporation, demonstra que há grande interesse comercial por estas enzimas, principalmente devido ao potencial de uso de celulasas para produção de biocombustíveis de segunda geração.

A presente invenção descreve uma hidrólise parcial de celulose, empregando baixas concentrações de celulasas, para liberar componentes,

preferencialmente açúcares, que atuarão como indutores no processo de produção de celulasas, incrementando assim os títulos enzimáticos produzidos.

Neste sentido, a presente invenção vem proporcionar uma forma alternativa de indução adicional aos processos de produção de celulasas, levando a produção de maiores títulos enzimáticos devido a presença de indutores liberados a partir da degradação da celulose que será empregada nos meios de produção.

A presente invenção apresenta diversas vantagens em relação ao estado da técnica, tais como:

10 \* o processo utiliza indutores liberados de processos de hidrólise parcial de celulose para a elevada produção das enzimas celulasas a baixo custo;

\* o processo permite a utilização da celulose parcialmente degradada para produção de celulasas como fonte de carbono e indutora;

15 \* possibilita maiores produtividades, visto que o emprego de indutores antecipa a produção de celulasas;

\* possibilita a obtenção de indutores de baixo custo em relação aos disponíveis no mercado, mais eficientes para a produção de celulasas.

O processo de produção de enzimas da presente invenção é uma alternativa aos processos conhecidos, pois, torna a produção mais rentável, visto que emprega o substrato que já é tradicionalmente empregado como fonte de carbono, porém, com a hidrólise parcial da celulose, os títulos enzimáticos são incrementados e os maiores títulos enzimáticos são obtidos em tempos menores.

25 Do que se depende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

30 Em um aspecto, a presente invenção proporciona um processo de produção de celulasas caracterizado por compreender

- pré-hidrólise de celulose,
- inoculação de celulose pré-hidrolisada, açúcares liberados da pré hidrolise e cultura de crescimento de *Penicillium echinulatum* com *Penicillium echinulatum*.

5 Em uma realização preferencial o *Penicillium echinulatum* é de linhagem 9A02S1.

Em uma realização preferencial os açúcares liberados da pré hidrolise são oligo-, di- e monossacarídeos.

10 Em uma realização preferencial a cultura de crescimento de *Penicillium echinulatum* compreender cultivos em estado sólido ou cultivos submersos.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

#### 15 **Breve descrição das figuras**

A Figura 1 apresenta as atividades de endoglicanases obtidas em cultivo de *Penicillium echinulatum* em meio contendo celulose parcialmente hidrolisada em diferentes tempos de hidrólise.

20 Na Figura 2 são apresentadas as atividades de endoglicanases obtidas em cultivos com *Penicillium echinulatum*, empregando celulose hidrolisada enzimaticamente durante diferentes tempos. A atividade apresentada no gráfico refere-se a atividade obtida em 48 horas de cultivo. Verifica-se que a produção de endoglicanases na amostra que foi hidrolisada por uma hora foi superior ao cultivo com celulose não hidrolisada.

25 A Figura 3 apresenta as medidas de pH obtidas durante o cultivo de *Penicillium echinulatum* contendo hidrolisados de celulose em frascos mantidos sob agitação recíproca. Verifica-se que os meios formulados com celulose parcialmente hidrolisada apresentaram redução no pH anterior ao meio formulado com celulose não tratada enzimaticamente.

30 Na Figura 4 são apresentados os perfis de bandas de atividade de endoglicanases em gel contendo carboximetilcelulose e em mistura reacional

do caldo enzimático, produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 obtido do cultivo submerso controle, contendo 1% de celulose. A- Perfil da atividade de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) extraídas e precipitadas a partir de 2 µl do caldo enzimático. M - massa molecular. Na lateral direita encontram-se as informações dos valores da massa molecular. A) celulose não tratada enzimaticamente, B) celulose parcialmente hidrolisada durante 30 minutos, C) celulose parcialmente hidrolisada durante 1 hora. Verifica-se maior quantidade de bandas nas amostras que foram produzidas na presença de celulose parcialmente hidrolisada.

A Figura 5 ilustra os dados obtidos na cromatografia de interação iônica para quantificação dos açúcares liberados da hidrólise parcial da celulose. A figura A mostra o tempo inicial (tempo zero) e, na figura B, após 1 hora de hidrólise.

15

#### **Descrição Detalhada da Invenção**

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

#### **20 Processo de produção de enzimas**

A presente invenção descreve o processo de produção de enzimas compreendendo o emprego de celulose parcialmente hidrolisada e açúcares liberados da hidrólise parcial da celulose.

Em uma realização preferencial, a celulose é parcialmente hidrolisada empregando enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases, etc..).

Em uma outra realização preferencial, são empregados os açúcares liberados da hidrólise parcial da celulose.

Em outra realização preferencial, são empregados os açúcares liberados da hidrólise parcial da celulose juntamente com a celulose parcialmente hidrolisada.

30

Em uma realização preferencial, o processo de produção compreende a produção das enzimas em cultivos em estado sólido.

Em outra realização preferencial, o processo de produção compreende a produção em cultivos submersos.

#### 5 Uso de celulose parcialmente hidrolisada para produção de celulases

A presente invenção também descreve o uso de celulose parcialmente hidrolisada e dos oligo- di- e monossacarídeos liberados da hidrólise da celulose para produção de enzimas, preferencialmente celulases.

#### P. echinulatum denominada 9A02S1

10 P. echinulatum denominada 9A02S1, é linhagem mutante de Penicilium echinulatum linhagem 9A02S1, depositada no Centro Depositário DSMZ, na Alemanha, com registro de depósito número DSM18942. Número de acesso par ao depósito : DSM18942; data de depósito : 17/01/2007; Nome e endereço da instituição depositária: Centro Depositário DSMZ, Alemanha, DSMZ GmbH,  
15 Inhoffenstrasse 7 B, 38124 Braunschweig. A linhagem pode ser facilmente crescida em meio Potato dextrose Agar na temperatura de 28 C.

A presente invenção também descreve um substrato compreendendo celulose parcialmente hidrolisada para produção de enzimas, preferencialmente celulases.

20

#### Exemplo 1. Realização Preferencial

Na presente invenção, foram desenvolvidos processos de produção de celulases empregando celulose parcialmente hidrolisada enzimaticamente ou empregando os oligo-, di- e monossacarídeos liberados da hidrólise da celulose  
25 para produção de enzimas. A produção de celulases empregando este substrato pode ser realizada tanto por fungos como por bactérias, em cultivos submersos e/ou em estado sólido. O processo é inovador e visa preencher diversas lacunas encontradas no estudo da técnica, apresentando diversas alternativas para a produção de maiores títulos enzimáticos em menores  
30 tempos, empregando substratos (substâncias indutoras) e técnicas de baixo

custo, o que possibilita uma maior eficiência econômica no processo de produção de celulases, diferenciando esta tecnologia das demais existentes.

Nas Figuras 1 a 4 são apresentados alguns resultados que evidenciam a importância da utilização de celulose parcialmente hidrolisada e de oligossacarídeos liberados da celulose para a indução da produção de celulases.

O exemplo a seguir detalha melhor a metodologia utilizada pelo inventor:

**Exemplo 1: Produção de celulases empregando celulose parcialmente hidrolisada**

10 Neste exemplo, a produção de enzimas foi realizada empregando um fungo mutante de *P. echinulatum*, fato este que constitui novidade, pois os mutantes de *P. echinulatum* ainda não foram utilizados para a produção de celulases em meio formulado com celulose parcialmente hidrolisada e/ou com os oligo-, di- e monossacarídeos liberados da hidrólise parcial da celulose para a produção de celulases.

15 A hidrólise enzimática é realizada com um complexo enzimático contendo hidrolases (celulases, hemicelulases, etc.), empregando cargas enzimáticas na faixa de 0,1 a 50 FPU/g de substrato e por diferentes tempos.

20 À celulase parcialmente hidrolisada são adicionados sais minerais, farelo de soja e trigo e água destilada. Esta mistura é autoclavada inoculada com microrganismos produtores de celulases que é incubada para o desenvolvimento do microrganismo e para produção. Para a coleta das enzimas, realiza-se uma filtração e/ou centrifugação do cultivo para a remoção do micélio e o caldo enzimático é recolhido. Alternativamente, também é possível a utilização dos preparados enzimáticos sem a filtração ou centrifugação.

25 Os versados na arte valorizarão o processo aqui proposto como uma excelente alternativa aos processos de produção de celulases já existentes e muito colaboram para a otimização dos processos de produção e aumento da produtividade. Estes fatores possibilitaram o desenvolvimento de processos de 30 baixo custo com elevadas produtividades e rendimentos.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

### **Reivindicações**

1. Processo de produção de celulases **caracterizado por** compreender
  - a) Pré-hidrólise enzimática de celulose ;
  - b) Inoculação da celulose pré-hidrolisada, dos açúcares liberados da pré hidrolise e de um meio de cultura de crescimento de *Penicillium echinulatum* com *Penicillium echinulatum*.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** pré-hidrólise enzimática ser realizada com enzimas hidrolíticas em uma concentração de 0,1 a 50 FPU/g de substrato.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pela** pré-hidrólise enzimática ser realizada em uma solução compreendendo 1% de celulose.
4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pela** pré-hidrólise enzimática ser realizada por 30 min a 60 minutos.

## Figuras

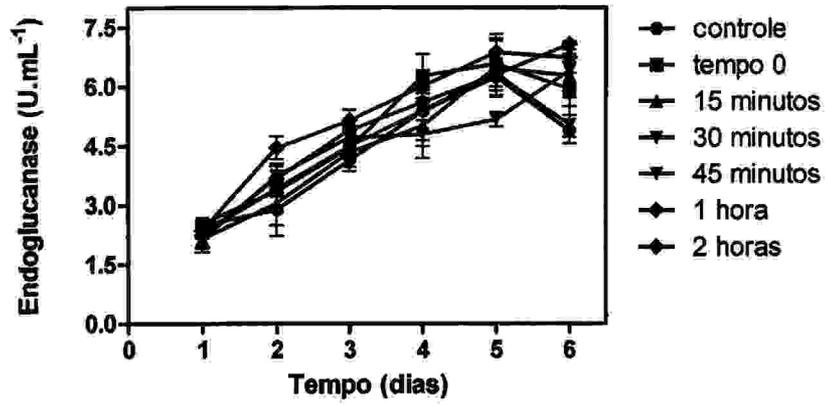


Figura 1

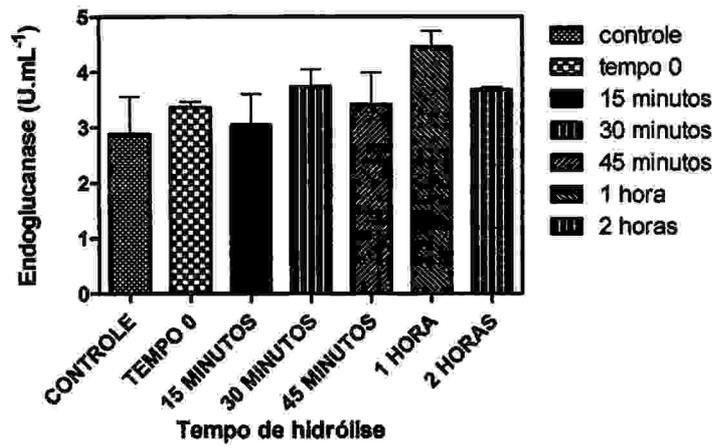


Figura 2

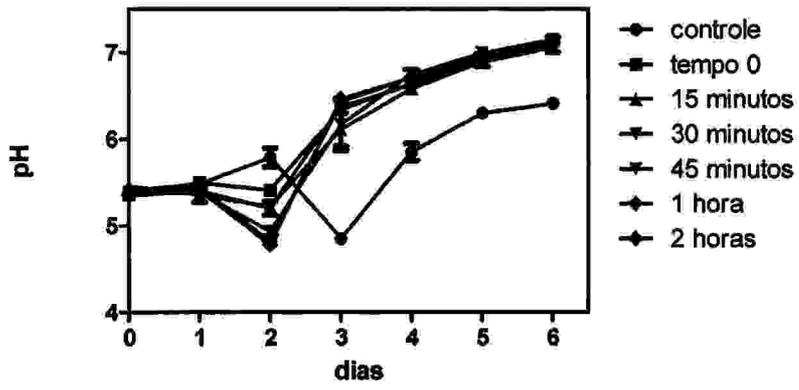


Figura 3

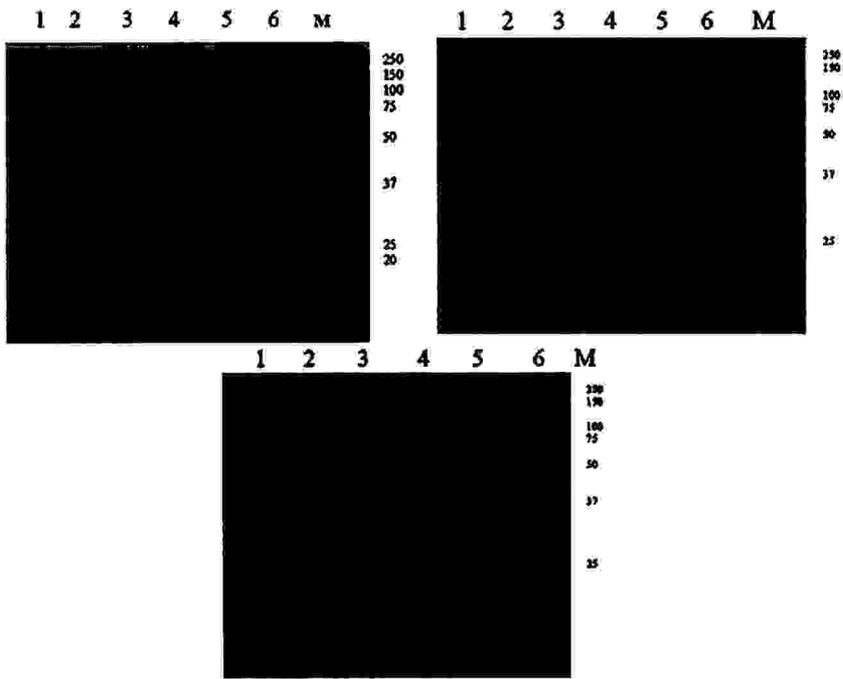
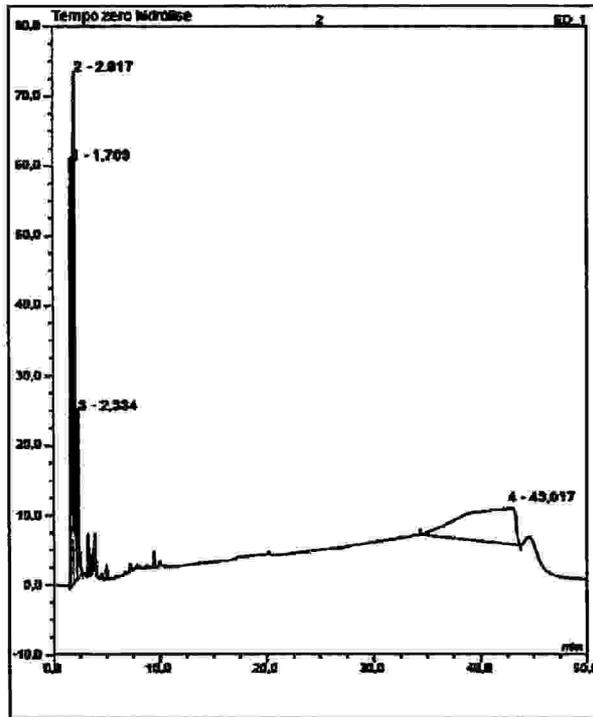


Figura 4

A



B

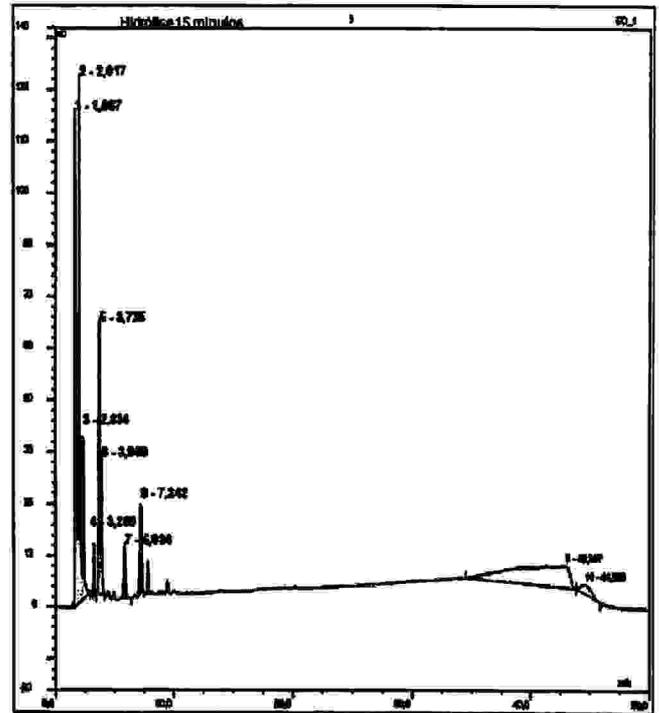


Figura 5