



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102023010544-0 A2

(22) Data do Depósito: 30/05/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
10/12/2024

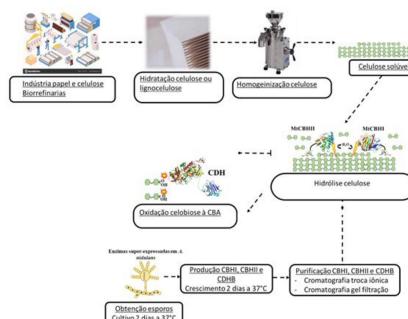
(54) Título: PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CELOBIÔNICO (CBA) A PARTIR DE MATERIAL DE CELULOSE OU LIGNOCELULOSE

(51) Int. Cl.: C12P 7/58; C12P 19/12.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): FERNANDO SEGATO; BIANCA OLIVA; GABRIELA LEILA BERTO; JOSMAN ANDREY VELASCO MENDOZA; IGOR POLIKARPOV.

(57) Resumo: PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CELOBIÔNICO (CBA) A PARTIR DE MATERIAL DE CELULOSE OU LIGNOCELULOSE. A presente invenção refere-se à produção de ácidos aldônicos, mais precisamente de ácido celobiônico, a partir de matéria-prima renovável de origem não animal, desfibrilada em ultra refinador de discos. A polpa de celulose desfibrilada foi utilizada como substrato para alimentar o sistema de produção de ácido celobiônico por via enzimática. Tal sistema é constituído por duas etapas: (i) ação de um conjunto de enzimas hidrolíticas com atividade de exoglucanase do tipo I e II (celobiohidrolases, CBHI e CBHII), com ação sobre as cadeias de celulose, resultando como produto principal, unidades de celobiose; (ii) pela adição ao sistema da oxidorredutase celobiose desidrogenase (CDH), a qual tem como mecanismo de ação a capacidade de oxidar as moléculas de celobiose, previamente produzidas pelas CBHs, convertendo este carboidrato em ácido aldônico. O referido sistema também permite a produção de ácidos apresentando cadeias de maior grau de polimerização. A presente invenção pode ser aplicada na área de cosméticos (como parte da formulação de produtos tópicos com origem vegana), nanotecnologia (liberação controlada de fármacos), em alimentos (controle biológico de contaminantes) e na área médica e hospitalar (estabilização de órgãos (...)).



**PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CELOBIÔNICO (CBA) A PARTIR
DE MATERIAL DE CELULOSE OU LIGNOCELULOSE**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo da Biotecnologia, especificamente na área de bioprocessos, e descreve a produção de ácidos aldônicos, mais precisamente de ácido celobiônico, a partir de matéria-prima renovável de origem não animal. A aplicação é abrangente na área de cosméticos, nanotecnologia, em alimentos, e na área médica e hospitalar.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] O interesse de diversos setores na utilização de ácidos orgânicos derivados de carboidratos tem aumentado drasticamente. Tal interesse é devido à necessidade em se substituir compostos obtidos de fontes não renováveis e impulsionar a integração de produtos de alto valor agregado às biorrefinarias (Mehtiö et al., 2016). Adicionalmente, existe uma crescente preocupação com a utilização de matéria-prima de origem animal, o que resulta no incentivo a produtos veganos (utilizando apenas ingredientes de origem vegetal).

[003] Os ácidos aldobiônicos (ABA) consistem em um monossacarídeo quimicamente unido a um polihidroxiácido por uma ligação do tipo éter, ou podem também ser interpretados como a forma oxidada de um oligossacarídeo. O ácido celobiônico (4-O- β -D-glucopiranosil-ácido D-glucônico, CBA) pode ser classificado como um ácido orgânico, açúcar ácido ou ABA (Mehtiö et al., 2016; Sauer et al., 2008; Yu & Scott, 2008), obtido a partir da oxidação da celobiose ($C_6H_{12}(OH_4)_2$), que é um dissacarídeo formado por duas unidades de glicose unidas por uma ligação do tipo β -1-4 (Figura 1A). Em geral,

os ABA têm propriedades físico-químicas favoráveis para compor formulações cosméticas, devido a sua solubilidade em água e acidez fraca, tornando-se adequados para aplicação em peles sensíveis.

[004] É comprovado que os hidroxiácidos orgânicos, como o CBA, são compostos naturais que podem modular vários processos, como por exemplo, o de queratinização da pele, e apresentam a capacidade de combater os radicais livres, podendo ser utilizados em tratamentos para o rejuvenescimento da pele (Yu & Scott, 2004). Tal mecanismo é devido a sua capacidade de aumentar a biossíntese de alguns componentes, como o colágeno e o ácido hialurônico, auxiliando no espessamento deste tecido e em suas propriedades antioxidantes. Além disso, os ácidos orgânicos são considerados blocos químicos primários (*building-blocks*) e podem ser utilizados como matéria-prima para síntese de diversos compostos de maior complexidade que atualmente são obtidos a partir de derivados do petróleo como monômero de vinil acetato, herbicidas, estabilizantes de alimentos, acidulante, detergentes, componentes de produtos farmacêuticos (Du et al., 2015). São também considerados quelantes naturais de alta eficiência, pois sequestram metais e compostos tóxicos pela formação de complexos solúveis e possibilitam sua captura, sendo utilizados como agente sequestrante natural na área médica, na indústria e na agricultura (Escandar et al., 1991).

[005] As aplicações do CBA ainda são preliminares, porém, apresenta grande potencial para compor a matriz de géis (auxiliando na proteção da pele inflamada ou em feridas), uso tópico em cabelo, unha, pele e mucosas para o

tratamento de feridas, como parte da composição de xampu, cremes para o corpo e o rosto, máscaras faciais, tratamento da acne, e propriedades antioxidantes comparáveis aos do ácido ascórbico (vitamina C) (Yu & Scott, 2004). A limitação da abrangência das aplicações do CBA muito se deve à falta de metodologias eficazes para sua produção em larga escala. Apesar disso, o mercado de ácidos orgânicos vem aumentando, no entanto, métodos de produção ainda não são capazes de alcançar as demandas industriais (Du et al., 2015; Sauer et al., 2008).

[006] A matéria-prima celobiose em sua forma pura (\geq 98%) tem custo de aproximadamente R\$ 12.105,00/kg (doze mil, cento e cinco reais por quilograma), comercializado pela empresa Sigma-Aldrich (disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/c7252>).

Outra empresa fornecedora de celobiose no Brasil, Éxodo Científica, comercializa o material importado com o valor de aproximadamente R\$ 54.422,40/Kg (cinquenta e quatro mil, quatrocentos e vinte e dois reais e quarenta centavos por quilograma). Além disso, não existe no Brasil, empresas que produzem este composto (apenas comercializam o composto importado), portanto, um processo que utilize uma matéria-prima de baixo custo para a produção de CBA é economicamente interessante como estratégia nacional.

[007] Atualmente, a produção do CBA é realizada por poucas empresas internacionais e é comercializado na sua forma de sal (sal de amônio). Empresas como *Toronto Research Chemicals* (Toronto, Canadá), *Biosynth* (Staad, Suíça), *CD BioGlyco* (Shirley, NY, EUA) e *Clinivex Inovative Solutions* (Toronto, Canadá) são responsáveis por sua comercialização.

A empresa *BioGlyco* produz os sais de CBA por método sintético (disponível em: <https://www.bioglyco.com/cellobionic-acid-ammonium-salt-item-1635.html>) e a empresa *Clinivex* pelo processo de ozonização da celobiose (disponível em: <https://theclinivex.com/cellobionicacid-ammonium-salt.html>).

[008] Um dos ácidos adônicos bem estabelecido do ponto de vista comercial e industrial, é o ácido lactobiônico (LBA), composto por uma unidade de galactose unida a uma glicose oxidada em C1, que é estruturalmente bastante similar à celobiose (Figura 1B). O LBA já possui consolidada aplicação na área médica como componente de soluções estabilizadoras durante o transporte de órgãos a serem transplantados (coração, pulmão, fígado, rins etc.), devido a sua capacidade de quelar metais e reduzir a ação oxidativa ao tecido. Ainda, é componente de agentes estabilizantes em formulações de proteínas terapêuticas, principalmente as citocinas (Interferons) utilizadas em oncologia (Climent et al., 2011). O LBA também é alvo de investigações para uso em formulações para aumentar a absorção de cálcio no intestino, uma vez que é capaz de formar um complexo com esse elemento, aumentando a sua solubilidade e facilitando sua assimilação pelo corpo humano (Nakano et al., 2006).

[009] O CBA, por ser um estereoisômero do LBA, é um potencial substituinte desse composto nas formulações cosméticas, médicas, farmacêuticas, alimentícias onde o LBA já possui vasta aplicação. Pelo fato de o LBA ser de origem animal (oxidação da lactose) é de extremo interesse das indústrias fazer a substituição deste composto, sendo o CBA um excelente e promissor candidato pela sua similaridade e

por ser de origem vegetal (oxidação da celobiose). O CBA não apresenta relação com o manejo de animais, sendo um produto considerado sem crueldade com animais (*cruelty-free*). Outra questão importante, relacionada à utilização de produtos de origem animal, é o risco de contaminação por vírus e príons. No entanto, a produção do CBA ainda está subdesenvolvida, utilizando de sínteses químicas, custosas e poluentes, ou por microrganismos que necessitam de meios complexos de fermentação, metodologias de produção pouco aplicadas na indústria (*resting cells*) e processos *downstream* mais rigorosos para recuperação do CBA com alta pureza, fatores que impedem a ampliação e aplicação comercial em larga escala. Nesta problemática, se faz necessário o desenvolvimento e o aprimoramento de métodos de produção mais sustentáveis, que não gerem subprodutos ou impurezas, e que apresentem maior facilidade no processo de purificação e obtenção do produto.

[010] A celobiose, matéria-prima de origem vegetal para a produção do CBA, pode ser obtida a partir de diversas fontes lignocelulósicas como bagaço e palha de cana-de-açúcar, eucalipto, pinus, palha de milho, palha de trigo, algodão, papel, fibras vegetais como a juta e polpa de celulose obtida após a sacarificação da celulose (Vedovato et al., 2020).

[011] Inicialmente, a produção de CBA foi relatada por via eletroquímica, oxidação química ou pirólise utilizando catalisadores potencialmente tóxicos, custosos e que geram subprodutos indesejáveis, além de dispendiosos processos de *downstream* para recuperação do CBA, e dificuldades no tratamento e descarte do efluente gerado, o qual contém

metais pesados (Haffenden and Yaylayan, 2008; Frush, 1963; Yang and Montgomery, 2005). Outras desvantagens desses processos são o uso da celobiose comercial como produto de partida (matéria-prima com alto valor agregado) e de catalisadores químicos como bromo, ozônio, carbonato de cálcio e nitrogênio gasoso. Mais especificamente, a pirólise dos carboidratos para geração dos ácidos aldônicos necessita de elevadas temperaturas (em torno de 250 °C) em atmosfera de hélio ou ambiente aeróbico (ar), gerando uma mistura de vários componentes (lactonas ou sacarina) (Haffenden and Yaylayan, 2008), resultando em um processo custoso e não-seletivo.

[012] A produção por catalisadores inorgânicos (oxidação química) é incompatível com a produção em larga escala, por falta de seletividade, uso de metais danosos à saúde e frequente desativação do catalisador (Besson et al., 1995; Climent et al., 2011; Governo et al., 2004). A produção por via eletroquímica é passível de ser escalonada para produção industrial, porém utiliza de eletrodos contendo metais pesados, tóxicos e custosos como o bromo, ouro, irídio e platina, elevado uso de energia elétrica e a liberação de CO₂ no processo (Isbell et al., 1932; Isbell and Frush, 1931; Parpot et al., 2010; Vedovato et al., 2020).

[013] Nesses processos o CBA gerado é recuperado pelo uso de solventes, como a acetonitrila, e de colunas compostas de carvão ou de aminopropil/sílica (Frush, 1963; Li et al., 2015; Lemeune et al., 2000; Moe et al., 2002). A inconveniência dessas técnicas, que usam componentes não ambientalmente corretos (metais pesados, solventes, condições extremas de temperatura e gasto de energia

elétrica), promovem uma alta demanda por processos alternativos de obtenção de CBA de modo ambientalmente correto e sustentável usando celulose como matéria-prima e catalisadores biológicos para sua conversão.

[014] Atualmente, tem sido descrita a produção através do uso de células de microrganismos, pois é observada a produção de CBA por bactérias produtoras de ácido acético, arqueias e alguns eucariotos (Kiryu et al., 2015; Mehtiö et al., 2016). Nestes processos, as células microbianas assimilam a celobiose contida no meio de cultivo e promovem a sua oxidação no ambiente intracelular, gerando CBA que, posteriormente, será transportado para o meio extracelular e recuperado do meio de cultivo para os processos de *downstream*. As fontes de carbono utilizadas podem ser complexas ou poliméricas como papel, celulose ou resíduos lignocelulósicos, ou estruturalmente mais simples, como é o caso da celobiose.

[015] Em linhagens bacterianas selvagens, como *Gluconobacter frateurii* NBRC3285 e *Fibrobacter succinogenes* S85, o mecanismo de oxidação da celobiose acontece naturalmente, porém com baixos valores de conversão (abaixo de 10,8%) (Mao et al., 2018; Nouaille et al., 2009). Já, em bactérias como *Pseudomonas fragi* e cepas de *Pseudomonas taetrolens* geneticamente modificadas (OGM), o rendimento apresentou valores de conversão de 40 a 100% utilizando celobiose comercial e celobiose obtida de papel reciclado (Kiryu et al., 2015; Oh et al., 2022; Yoo et al., 2022).

[016] No processo de produção a partir de papel reciclado, duas etapas foram necessárias. Inicialmente, ocorre a hidrólise enzimática do papel, seguida de uma etapa

de fermentação bacteriana utilizando a celobiose gerada para produção de CBA. Na hidrólise foi utilizado um coquetel comercial de celulases para hidrolisar o material para a obtenção de celobiose. Porém, a impureza dos coquetéis comerciais ou do uso de coquetéis não-específicos (obtidos através de microrganismos contendo vários tipos de enzimas) resulta em uma incoerência, pois diminui a eficiência do processo de obtenção máxima da celobiose, uma desvantagem, quando comparado com a presente invenção. Como ocorreu nesse caso, somente 62% da celulose (49,6 g/L) contida no papel reciclado foi hidrolisada em celobiose (23 g/L), acompanhada por uma grande parcela da celobiose que foi convertida à glicose (21,1 g/L). Isto ocorre pela presença de uma classe de enzimas denominadas β -glicosidases nos coquetéis comerciais, que convertem rapidamente celobiose em duas unidades de glicose.

[017] Em suma, o rendimento de produção de celobiose é drasticamente afetado nesse processo devido ao uso de coquetéis comerciais não específicos para a produção de CBA. Em seguida, na etapa de fermentação o OGM utiliza os açúcares gerados (glicose e xilose) como fonte de carbono, e a celobiose é direcionada para produzir CBA. A temperatura de hidrólise (50 °C) e de cultivo (25 °C) do microrganismo não são similares, deste modo, o sistema deve passar por um processo de resfriamento das soluções, sendo uma etapa crítica do ponto de vista de produção industrial. A presente invenção, por sua vez, utiliza um processo isotérmico constante, coquetel enzimático específico de alta eficiência e tempo de produção reduzido (48h) apresentando superioridade e vantagem frente à produção de CBA por

microrganismos.

[018] Com relação aos processos de produção de CBA que fazem uso de fungos, o secretoma do ascomiceto *Chaetomium cellulolyticum* foi capaz de produzir CBA a partir da hidrólise de resíduos de papéis e celulose pura deslignificada (Solka Floc). Os fungos são naturalmente capazes de produzir um conjunto de enzimas específicas relacionadas ao substrato que colonizam. Logo, é possível cultivá-lo em um substrato desejado, e este induz a expressão e secreção de enzimas relacionadas à clivagem dele. Utilizando dessa técnica, foi descrito a ação do secretoma de *C. cellulolyticum*, o qual, em 32 h de reação foi capaz de hidrolisar 47% do resíduo de papel, dos quais 29% resultaram na produção de CBA. Já em celulose pura, em 48 h o secretoma de *C. cellulolyticum* hidrolisou 91%, resultando em uma produção de 18% de CBA (Fähnrich and Irrgang, 1982). Deste modo, novamente é ressaltado que a produção de CBA foi acompanhada por elevada concentração de glicose em ambos os casos (46-57%) diminuindo a eficiência da metodologia.

[019] Uma linhagem OGM do fungo *Neurospora crassa* foi cultivada em Avicel (celulose cristalina comercial) e, após 168 h de incubação, foi capaz de hidrolisar 62% da celulose cristalina (20 g/L) dos quais 29% foram convertidos em CBA (3,5 g/L) (Hildebrand et al., 2015). É possível implementar um sistema ABTS-Lacase ao processo para acelerar a reoxidação da enzima cellobiose desidrogenase (CDH), através da transferência de elétrons da CDH para o sistema ABTS-Lacase (Baminger et al., 2001). Utilizando essa estratégia durante a fermentação de *N. crassa*, a conversão da celulose foi de 67% dos quais 91% resultaram na produção de CBA (Hildebrand

et al., 2015). Porém, o inconveniente da fermentação fúngica é o tempo de crescimento necessário dos esporos (10 dias) e o tempo de fermentação (168 h). Além disso, a adição de mediadores redox, como o ABTS, eleva o custo do processo de produção e as etapas *downstream* para a separação desse composto ao CBA.

[020] Outro sistema reportou o uso de mediadores redox e a enzima lacase para oxidação de lactose pela enzima CDH em biorreator (na temperatura de 30 °C) (Ludwig et al., 2004) e declararam que o aumento da temperatura no processo pode ser vantajoso pois aumenta a velocidade de reação e, consequentemente, a produtividade. Porém, nesse estudo os autores evidenciaram a desvantagem do biocatalisador utilizado (CDH do fungo basidiomicetó *Athelia (Sclerotium) rolfsii*), pois foi drasticamente afetado pelo aumento da temperatura. De modo a superar essa barreira, aplicar enzimas obtidas a partir de fungos termotolerantes ou termofílicos, como *Thermothelomyces thermophilus*, é a estratégia utilizada no processo descrito na presente invenção, pois estas são fontes de enzimas mais termicamente estáveis. Além disso, no estudo de Ludwig et al. (2004) foi evidenciado uma perda de atividade da enzima CDH devido ao fornecimento de oxigênio no sistema, o qual é essencial para a atividade da lacase (um custo extra no processo). No entanto, na presente invenção, o sistema é simples e não requer fluxo de oxigênio dissolvido, pois utiliza a estratégia de sistema em batelada e não faz uso da enzima lacase (que necessita do oxigênio).

[021] Neste sentido, a presente invenção se refere a uma tecnologia de produção de CBA a partir de celulose obtida de materiais lignocelulósicos, matéria-prima renovável,

largamente disponível e produzida no Brasil, por via biotecnológica de alta performance e eficiência. A vantagem dos processos biotecnológicos frente aos que fazem uso de oxidação por rota química é de não haver necessidade de utilização de equipamentos robustos e resistentes a processos corrosivos. A presente metodologia é ecologicamente correta, pois utiliza biocatalisadores específicos (celulases e celobiose desidrogenase), sendo moléculas ambientalmente corretas, não geram subprodutos indesejáveis, sendo esta característica extremamente vantajosa para futuras aplicações na indústria farmacêutica e de cosméticos que requerem altos níveis de pureza. O processo apresenta níveis extremamente baixos de contaminação da reação, sendo a reação isotérmica, utilizando biocatalisadores termoestáveis (CBHI, CBHII e CDH do fungo termofílico *T. thermophilus*) o que possibilita reações com temperaturas mais elevadas, promovendo o aumento da produtividade, sem afetar as enzimas do sistema.

ESTADO DA TÉCNICA

[022] Alguns documentos do estado da técnica descrevem a produção de ácidos aldônicos a partir de matéria-prima renovável, dentre eles ácido celobiônico, tais como:

[023] O artigo científico intitulado "PROTEIN PROFILE IN ASPERGILLUS NIDULANS RECOMBINANT STRAINS OVERPRODUCING HETEROLOGOUS ENZYMES" descreve que fungos são excelentes formas de produzir enzimas industrialmente relevantes. O referido documento investiga o perfil proteômico global de cepas recombinantes de *Aspergillus nidulans* a fim de entender a produção enzimática e, ainda, versa sobre a produção de celobiohidrolases.

[024] De fato, diversas linhagens fúngicas têm sido cientificamente e industrialmente utilizadas para a produção de proteínas de interesse, sendo estas recombinantes ou não. Dentre estes microrganismos, fungos do gênero *Aspergillus* também têm sido alvo de diversos estudos e aplicações, pois são de interesse industrial, tais como *A. niger* e *A. oryzae*. Além disso, o fungo *A. nidulans*, por se tratar de um fungo modelo, também tem sido explorado. De modo geral, quando um secretoma é analisado de maneira global, a principal proteína produzida pela maioria dos fungos é a celobiohidrolase do tipo I (CBHI), pois existem ao menos 4 cópias gênicas por genoma. Apesar de já ter sido estudado e reportado que o fungo *A. nidulans* pode ser utilizado como produtor de enzimas heterólogas, na presente invenção não está sendo considerado como alvo a produção das enzimas envolvidas (CBHI, CBHII e CDH). Neste sentido, a presente invenção revela o processo de produção do ácido celobiônico e suas variáveis de processo. Adicionalmente, no referido documento, é apresentada a clonagem e a expressão de uma celobiohidrolase proveniente de um organismo diferente (*A. fumigatus*) daquele utilizado na presente invenção, o fungo *T. thermophilus*.

[025] O artigo científico intitulado "ENGINEERING *NEUROSPORA CRASSA* FOR IMPROVED CELLOBIOSE AND CELLOBIONATE PRODUCTION" discorre sobre a modificação genética do fungo *Neurospora crassa* para produção de ácido celobiônico, e revela que o ácido celobiônico pode ser obtido pela ação de enzimas celobiohidrolases com ação sobre as cadeias de celulose, resultando como produto principal a celobiose e, sequencialmente, pela adição ao sistema da oxidorredutase celobiose desidrogenase (CDH) para oxidar as moléculas de

celobiose, previamente produzidas pelas CBHs, convertendo este carboidrato em ácido aldônico (ácido celobiônico).

[026] A enzima celobiohidrolase é a principal proteína no processo de despolimerização da celulose e tem sido alvo de estudo em diversas frentes. Por se tratar de uma enzima chave no processo, estudos envolvendo a sua inibição tem sido de extrema importância uma vez que é um fator limitante no processo de hidrólise da celulose. Sendo assim, o artigo científico "CELLOBIONIC ACID INHIBITION OF CELLOBIOHYDROLASE I AND CELLOBIOSE DEHYDROGENASE" aponta sobre o grau de inibição das enzimas celobiohidrolase I (CBHI), de *Trichoderma reesei* (obtida comercialmente), e celobiose desidrogenase (CDH), de *Neurospora crassa* produzida em *Pichia pastoris*, por celobiose e por celobionato (derivado do ácido celobiônico), em diferentes valores de pH.

[027] Nos estudos do referido documento, a celobiose foi adquirida comercialmente, já na presente invenção a celobiose foi gerada pela ação enzimática das celobiohidrolases, enquanto o celobionato foi sintetizado por via química. Além disso e, principalmente, não foi reportada experimentalmente a combinação das enzimas CBHI e CDH na produção de ácido celobiônico, assim como a análise da eficiência das enzimas CBHI e CBHII em diferentes combinações (esta última nem sequer é testada no referido documento). Apenas é feita a caracterização bioquímica e a avaliação do comportamento dessas enzimas e seu grau de inibição na presença dos compostos mencionados. Portanto, não foi revelada a combinação e proporção ideal das enzimas celobiohidrolases da família GH7-CBHI e GH6-CBHII para a clivagem da celulose e nem a combinação e adição da CDH ao

sistema para a conversão da celobiose gerada em ácido celobiônico, a partir do substrato celulose solúvel.

[028] O documento patentário US 2013/280764 A1 intitulado "METHOD OF IMPROVING THE ACTIVITY OF CELLULASE ENZYME MIXTURES IN THE SACCHARIFICATION (LIGNO) CELLULOSIC MATERIAL" versa sobre a obtenção de fungos modificados compreendendo um ou mais genes que codificam enzimas com uma ou mais atividades incluindo a obtenção de ácido celobiônico.

[029] Todavia, o referido pedido de patente descreve como realizar a deleção (*knock-out*) de genes que codificam enzimas envolvidas na conversão de derivados da celulose (oligos- e monossacarídeos) em seus ácidos orgânicos (celobionolactona, ácido celobiônico, gluconolactona, ácido glucônico e compostos relacionados), uma vez que estes interferem/inibem a atuação de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação dos materiais lignocelulósicos. Portanto, o referido documento descreve um processo que vai na direção oposta ao que está sendo proposto pela presente invenção, que é justamente estimular a produção de ácido celobiônico. O referido documento também descreve a degradação de lignocelulose, material biológico diferente da presente invenção que compreende a obtenção de ácido celobiônico a partir de polpa de celulose, material já processado pela indústria. Além disso, na presente invenção não foi utilizado o secretoma do fungo para realizar a conversão de celulose em ácido celobiônico, e sim, CBH e CDH previamente selecionadas por métodos de bioinformática (originárias de fungo termofílico) e expressas heterologamente foram purificadas (separadas do secretoma) e utilizadas em combinação para tal fim.

[030] O artigo científico intitulado “EFFICIENT PRODUCTION OF SUGAR-DERIVED ALDONIC ACIDS BY PSEUDOMONAS FRAGI TCCC11892” revela que o ácido celobiônico é um importante intermediário durante a degradação da biomassa celulósica por vários fungos lignocelulolíticos e bactérias. Sua produção a partir da celobiose é alcançada utilizando a celobiose desidrogenase e a ação combinada do polissacarídeo monooxigenase e da celobiohidrolase.

[031] No referido documento é abordado o estudo de quatro linhagens da bactéria *Pseudomonas fragi* na produção, de maneira geral, de ácidos aldônicos. Para tal, a bactéria é utilizada como microrganismo no processo de fermentação utilizando como meio de cultivo produtos residuais da indústria de laticínios, como o soro, por exemplo (*waste product whey*). Tal meio, provê açúcares facilmente assimiláveis resultando na formação de vários ácidos aldônicos, dentre eles ácido celobiônico (em baixa concentração), ácido galactônico, ácido maltobiônico, ácido lactobiônico e L-rhamnoic pela ação da celobiose desidrogenase (CDH), não se tratando de um processo específico e direcionado. A presente invenção, por sua vez, determina condições e parâmetros para ocorrer somente a produção de ácido celobiônico.

[032] Inclusive, no referido documento, não é descrita a utilização da combinação de duas famílias de celobiohidrolases (GH7-CBHI e GH6-CBHII) para a clivagem de macromoléculas não facilmente assimiláveis, como a celulose, em monômeros, e realização de uma próxima etapa de oxidação pela CDH. Além disso, o processo descrito envolve diversas etapas, dentre elas precipitação com compostos químicos e

evaporação, demonstrando que a quantidade de ácidos aldônicos no meio bruto é baixa.

[033] O artigo científico intitulado "EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DA ENZIMA OXIDATIVA CELOBIOSE DESIDROGENASE NA SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA" descreve a expressão heteróloga, a caracterização bioquímica e a ação da enzima oxidativa celobiose desidrogenase do fungo *M. thermophila* (M77CDH) em conjunto com outras celulases no processo de sacarificação da biomassa. Ainda, o documento revela sobre a liberação de ácido celobiônico a partir de celobiose ao longo do tempo de reação em duas concentrações da enzima.

[034] Nesse estudo foi feita a caracterização bioquímica da enzima CDH e o ensaio de liberação de ácido celobiônico na presença de um coquetel de enzimas (envolvendo celobiohidrolases, endoglucanases, xilanases, entre outras), proveniente do secretoma de fungo *Trichoderma reesei*, e na presença de outra enzima oxidativa (LPMO) visando aumentar a degradação da celulose pré-tratada com ácido fosfórico (PASC, celulose amorfa). Porém, no referido documento, não foi utilizada uma combinação otimizada de celulases estritamente relacionadas à degradação da celulose e liberação de celobiose, produto este mais adequado para a ação da CDH. Além disso, no referido documento não se utilizou de tecnologias para processar mecanicamente a matéria-prima celulose, foi utilizado PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*), uma celulose tratada quimicamente para apresentar regiões amorfas. Na presente invenção foi feita a busca por matérias-primas puras e provenientes da indústria, como a polpa de celulose, e o refino dessa

matéria-prima para torná-la passível de ser utilizada em uma reação enzimática homogênea. Neste processo, as placas de celulose solúvel provenientes da indústria foram umedecidas e refinadas em refinador de discos para fracionar as fibras de celulose, aumentando a quantidade de extremidades redutoras e não-redutoras da celulose. Esse aspecto melhora a ação das enzimas celobiohidrolases, pois estas são dependentes das extremidades livres da celulose. O refino da polpa de celulose também favorece seu manuseio e facilita a formação de uma reação homogênea em água/solução tampão.

[035] O artigo científico intitulado "MOLECULAR AND CATALYTIC PROPERTIES OF FUNGAL EXTRACELLULAR CELLOBIOSE DEHYDROGENASE PRODUCED IN PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC EXPRESSION SYSTEMS" revela a expressão da enzima celobiose desidrogenase (CDH) em *E. coli* só e indica que todos os hospedeiros eucarióticos podem expressar CDH completo incluindo o domínio citocromo. A CDH produzida por *T. reesei* foi mais semelhante à CDH originalmente isolada do fungo *T. thermophilus* em relação à glicosilação, carregamento de cofatores e constantes catalíticas. Nas condições experimentais testadas, os hospedeiros de expressão fúngica produzem CDH de qualidade e uniformidade superiores em comparação com *P. pastoris*.

[036] No entanto, este estudo revela as particularidades da expressão heteróloga da enzima CDH de *Corynascus thermophilus* utilizando diferentes sistemas de expressão (eucariótico e procariótico). Dentre eles, os microrganismos *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. Portanto, o estudo não apresenta nenhuma abordagem sobre a produção de ácido

celobiônico a partir da combinação de diferentes famílias de celobiohidrolases (GH7-CBHI e GH6-CBHII). Novamente ressalta-se que não é objeto da presente invenção a expressão heteróloga da enzima CDH de *T. thermophilus* em *Aspergillus nidulans* e, sim, o método de produção do ácido celobiônico a partir de celulose proveniente da indústria de papel e celulose e de biorrefinarias através do conjunto de celobiohidrolases das famílias GH7-CBHI e GH6-CBHII em 24 h, e, após, a ação isolada da CDH por um período adjacente de 24 h. Tal abordagem, irá promover o acúmulo mínimo de subprodutos (quantidades mínimas de glicose) e uma reação totalmente direcionada para obtenção do ácido celobiônico de maneira precisa e utilizando a celulose como substrato inicial para a geração de celobiose.

[037] O artigo científico intitulado "CELLOBIOHYDROLASE 1 FROM TRICHODERMA REESEI DEGRADES CELLULOSE IN SINGLE CELLOBIOSE STEPS" revela que a celobiohidrolase 1 de *Trichoderma reesei* hidrolisa processivamente a celulose em celobiose. Ainda, o documento revela o processo de expressão desta enzima.

[038] Dentre os fungos filamentosos de interesse industrial, o fungo *Trichoderma reesei* tem sido um dos mais estudados, explorados e modificados. Tal interesse é devido a sua capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas ativas em lignocelulose, sendo a de maior importância, a celobiohidrolase I (CBHI). Devido a esta característica, esta enzima é também alvo de vários estudos, como o revelado no referido documento. O referido artigo científico reporta o comportamento da CBHI de *T. reesei* (TrCel7A) durante o processo de despolimerização da celulose. Diferente da

maioria das enzimas, as CBHs apresentam um mecanismo denominado de processividade, que é a capacidade da enzima se ligar ao substrato e percorrer certas distâncias. Uma vez que TrCel7A é uma enzima modular, ou seja, contém um módulo de ligação ao carboidrato (CBM de *Carbohydrate Binding Module*) e um domínio catalítico (CD), infere-se que a processividade é relacionada à presença do CBM.

[039] Sendo assim, o referido documento apresenta a obtenção da enzima TrCel7A do extrato bruto de *T. reesei* e a expressão heteróloga em *E. coli* dos módulos CBM e CD separados. Tal abordagem permite avaliar a processividade da enzima em função dos módulos no substrato celulose, através da liberação do produto celobiose. Em contrapartida, a presente invenção revela sobre a tecnologia de processar a polpa de celulose proveniente da indústria e tratá-la pela combinação das celobiohidrolases GH7-CBHII e GH6-CBHII separadamente da CDH, e após geração de todo o produto celobiose, este ser utilizado como fonte para a ação oxidativa da CDH e geração de ácido celobiônico. Apesar de ser evidente que a CBH tem como substrato natural a celulose, a presente invenção propõe uma aplicação dessa enzima para geração de produto de alto valor agregado (ácido celobiônico a partir de celulose) através da combinação com celobiohidrolases de diferentes classes (família GH6 e GH7) e na presença de enzima oxidativa (CDH).

[040] Destaca-se que a produção de ácido celobiônico já foi obtida pela fermentação de microrganismos/fungos em lignocelulose e em açúcares fermentescíveis. É revelado no estado da técnica que CBHs atuam em celulose e CDHs oxidam monossacarídeos. Porém, até o momento, nenhum coquetel foi

especificamente desenvolvido para promover essa produção direcionada e a partir de polpa de celulose refinada. O estado da técnica constantemente utiliza de secretoma de fungos ou bactérias (diversas proteínas atuando em conjunto) para obter ácido celobiônico em baixas concentrações e/ou altamente impuros. Ainda, utilizam biomassa lignocelulósica e/ou açúcares facilmente fermentescíveis para tal. A presente invenção desenvolve uma nova aplicação utilizando a celulose solúvel como matéria-prima. É surpreendente o processamento da polpa de celulose, a classe de enzimas selecionadas para promover a degradação da celulose e liberação de celobiose, a proporção otimizada entre as enzimas (CBHs + CDH) para promover alta obtenção de ácido celobiônico sem gerar altos níveis de inibição das enzimas ou subprodutos e, além disso, a logística da metodologia desenvolvida dividida em duas etapas (hidrólise e oxidação).

[041] A presente invenção difere-se do estado da técnica, isoladamente ou tomado em conjunto, pois a metodologia utilizada é inovadora. As referências e trabalhos similares do estado da técnica revelam sobre a expressão heteróloga de enzimas por *A. nidulans*, a conversão de celulose em celobionato ou lactobionato através da fermentação fúngica (não utilizando uma classe específica de celulases) por *Neurospora crassa* geneticamente modificado e a inibição das enzimas CBH e CDH por celobiose e celobionato. Está claro que a junção da ação das enzimas CBH e CDH irá gerar ácido celobiônico (ou na sua forma de sal, celobionato). Porém, não foi descrito até o momento um procedimento para obtenção de ácido celobiônico a partir de celulose solúvel, processando essa matéria-prima de modo a

torná-la de fácil manuseio, utilizando da escolha racional entre classes sinérgicas de celulases (GH6 e GH7) e suas origens (fungo termofílico) no processo hidrolítico, a divisão do processo em hidrolítico (celulases) e oxidativo (CDH) e os parâmetros de processo (como temperatura, tempo de reação, carga de sólidos, carga de enzimas, proporção entre GH6 e GH7).

[042] Além disso, o estado da técnica foca apenas no estudo do mecanismo de ação e da presença das enzimas CBH e da inibição da enzima CBH pelo produto da enzima CDH. Em nenhum momento é explorada a produção de ambas as classes enzimáticas para obter como produto o ácido celobiônico, como é o caso da presente invenção. Ademais, com exceção do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* (não possui CDH), que é utilizado como plataforma industrial para produção de enzimas, qualquer outro fungo filamentoso é capaz de produzir as enzimas CBHs e CDH quando cultivados em substratos complexos como por exemplo biomassa lignocelulósica. Assim, a presente invenção propõe o uso de técnicas de biologia molecular para a produção racional de enzimas que podem ser utilizadas para a produção de ácidos orgânicos a partir de celulose.

[043] Por fim, o estado da técnica também revela que é possível converter (mesmo em baixa eficiência) açúcares celulósicos em ácidos aldônicos pela fermentação de organismos fúngicos, realizar a expressão heteróloga da CDH em diferentes sistemas como procarióticos e eucarióticos e que CBH atua em celulose, de forma processiva, gerando celobiose. Porém, salienta-se que na presente invenção foi feita a escolha racional das enzimas a serem utilizadas,

diferenciando do estado da técnica que utiliza todo o coquetel produzido pelo organismo para tal fim, uma mistura contendo mais de cem proteínas. Não é citado no estado da técnica sobre parâmetros de processos para que tal conversão de celulose solúvel em ácido celobiônico ocorra sem geração de vários subprodutos (outros ácidos aldônicos, metabólitos da fermentação bacteriana ou fúngica, metais pesados, meio de cultivo) que podem ser contaminantes. Na presente invenção, surpreendentemente, percebeu-se que desfibrilar a celulose solúvel promoveu a fácil hidrólise desse substrato, e que dele foi possível, em cerca de 48 horas, realizar sua conversão em ácido celobiônico pelo desenvolvimento de uma combinação de enzimas e ajustes de parâmetros de processo otimizados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objetivo propor um processo de produção de ácidos aldônicos, mais precisamente de ácido celobiônico, a partir de matéria-prima renovável. A polpa de celulose desfibrilada foi utilizada como substrato para alimentar um sistema de produção de ácido celobiônico por via enzimática. Tal sistema é constituído pela ação de um conjunto de enzimas hidrolíticas e da enzima oxidorredutase para converter carboidrato em ácido aldônico.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[044] Para obter uma total e completa visualização do objetivo desta invenção são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme segue.

[045] A Figura 1 ilustra em (A) a estrutura química da celobiose. Nesta estrutura a unidade monossacarídica à esquerda é a porção β -D-glucopiranosil da molécula e é unida

por uma ligação glicosídica β -(1,4') à β -D-glicopiranose, a aglicona. O átomo de oxigênio da ligação glicosídica está aproximadamente no centro da estrutura, entre os dois anéis. Ele é projetado para cima, equatorial e, portanto, é β e está ligado ao C-4 da aglicona configurando uma ligação equatorial-equatorial. Adicionalmente, em (B) é ilustrada a estrutura química da lactose. Nesta estrutura a unidade monossacarídica à esquerda representa a porção β -D-galactopiranosil da molécula também unida em uma ligação glicosídica β -(1,4') à β -D-glicopiranose, a aglicona. A galactose é o epímero C-4 da glicose, assim, o grupo hidroxila em C-4, que é equatorial na glicose, é axial na galactose.

[046] A Figura 2 ilustra a avaliação da proporção ideal de enzima CBHI e CBHII na hidrólise de celulose (0,6125%). A massa de CBHI foi fixada em um valor de 100% e foi substituída pela enzima CBHII em 5, 10, 15 e 20%, e com teor total de CBHs de 5 mg/g celulose. A reação ocorreu por 16 h a 50 °C e em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). A concentração de açúcares redutores liberados foi determinada por DNS.

[047] A Figura 3 ilustra a conversão de celulose (0,6125%) em celobiose pela ação das exoglucanases CBHI e CBHII. Para o ensaio foi utilizada a proporção de 80% CBHI + 20% CBHII com teor total variando em 5, 10 e 20 mg de proteína por grama de polpa de celulose. A reação foi realizada em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) por 72 horas a 50 °C.

[048] A Figura 4 ilustra um sistema de produção de ácido celobiônico a partir da polpa de celulose (0,6125%)

por coquetel enzimático específico. As exoglucanases tipo I e II (CBHI e CBHII, 20 mg/g) foram incubadas por um período de 24 horas. Como produto, foi detectada a liberação de cellobiose (5,34 g/L). Após este período, 13 mg da enzima CDH por grama de celulose (ou 2,0 μ M/g celulose) foi adicionada à reação (seta) e a cellobiose passou a ser oxidada a CBA, com acúmulo máximo em 48 horas de 4,08 g/L. O tempo total de reação foi de 72 horas, mantida a 50 °C, em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e a produção máxima de CBA foi em 48 horas. A conversão de celulose em cellobiose foi de 87,2%, de cellobiose em CBA de 76,4% e de celulose em CBA de 66,5%. Os produtos da reação foram analisados por HPAEC.

[049] A Figura 5 ilustra um fluxograma do processo da presente invenção.

[050] A Figura 6 ilustra graficamente a conversão de celulose solúvel em CBA por ação do coquetel de CBHs juntamente com CDHB.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[051] A presente invenção refere-se a um processo de produção de ácido celobiônico a partir da polpa de celulose ou de lignocelulose por via biotecnológica de alta performance e eficiência.

[052] O referido processo de produção de ácido celobiônico, conforme ilustrado no fluxograma da Figura 5, é realizado a partir das seguintes etapas:

- a. Obtenção de esporos e produção das enzimas CBHI, CBHII e CDHB; e
- b. Purificação das enzimas CBHI, CBHII e CDHB, e obtenção de um coquetel de enzimas CBHI e CBHII purificadas, e obtenção de CDHB purificada;

- c. Homogeneização da celulose ou lignocelulose até obtenção de uma solução de celulose ou lignocelulose;
- d. Hidrólise enzimática da celulose ou lignocelulose obtida em (c) com o coquetel de CBHI e CBHII purificadas em (b); e
- e. Oxidação enzimática da celulose ou lignocelulose obtida em (d) a ácido celobiônico, com a enzima CDHB purificada.

[053] Neste sentido, o material celulósico ou lignocelulósico obtido de resíduos industriais foi selecionado dentre: bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de milho e subprodutos da indústria sucro-alcooleira ou da indústria de papel e celulose, biomassa lignocelulósica, resíduo lignocelulósico da agroindústria ou da indústria de papel e celulose.

[054] O referido material foi previamente hidratado com água destilada e mantido a uma temperatura entre 4 e 25 °C por 24-48 horas. A suspensão celulósica (teor de sólidos 1-15% g/L, base seca, para diluição das fibras utilizou-se tampão) foi homogeneizada utilizando um desintegrador de polpa, seguindo a norma TAPPI T205. Na sequência, a suspensão foi desfibrilada em ultra refinador de discos (SuperMassColloider, com discos de óxido de alumínio e resinas). O ultra refinador foi alimentado manualmente com a suspensão de polpa celulósica durante 1 ciclo de refino (passagem do volume total de suspensão de polpa pelo sistema de ultra refino). O posicionamento dos discos foi estabelecido em amplitude de distância de -100 µm (a partir do zero em movimento), rotação variável entre 800 e 1600°

rpm (operado em 1600 rpm). O processo de ultra-refino seguiu até a redução drástica da largura da fibra (observado em analisador de partícula, por exemplo, Malvern) e melhor estabilidade coloidal da suspensão de fibras (avaliação visual do aspecto homogêneo). Após o processo de ultra-refino a suspensão de polpa foi mantida entre 4 a 16 °C para as posteriores análises.

[055] Para a obtenção das enzimas CBHI, CBHII e CDHB utilizadas no presente processo, foram inicialmente selecionados três genes do fungo termofílico *Thermothelomyces thermophilus* M77 (acesso no GenBank: XM_003660741, XM_003660984 e XM_003664495). Os referidos genes codificam três proteínas de ocorrência natural, sendo estas:

- uma exoglucanase do tipo I (CBHI, acesso XP_003660789);
- uma exoglucanase do tipo II (CBHII, acesso XP_003661032); e
- uma oxidorredutase ativa em celobiose denominada celobiose desidrogenase (CDH, acesso XP_003664543).

[056] A extração do DNA genômico iniciou-se inoculando esporos do fungo *T. thermophilus* M77 em 200 ml de meio de Mandels líquido (0,06 g de ureia, 0,15 g de peptona, 0,05 g de extrato de levedura, 0,28 g de (NH4)2SO4, 0,4 g de KH2PO4 e 0,06 g de CaCl2, e solubilizados em 200 ml de água destilada), foram mantidos a 45 °C sob agitação a 180 rpm durante 36 horas. Em seguida, os micélios foram separados por filtração em papel de filtro e macerados em cadrinhos de porcelana, adicionando nitrogênio líquido. Foram pesados 50 mg do macerado para serem utilizados no processo de extração

do DNA genômico com o Kit de purificação de DNA genômico Wizard (Promega®) seguindo as especificações do fabricante.

[057] Com o DNA genômico obtido, os genes foram amplificados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando o DNA genômico e oligonucleotídeos específicos (CDHB *forward* e *reverso* **CATTACACCTCAGCA**ATGAAGCTACTCAGCCGCGTTGGGGCGAC e **GTCCCGTGCCGGTTA**TTAAGACCGCAGGCCAGGATGCGCTG; CBHI *forward* e *reverso* **CATTACACCTCAGCA**ATGGGGCAGAAGACTCTCCAGGGG e **GTCCCGTGCCGGTTA**CTACAGGCACTGCGAGTACCAAGTCGTTCTG; e CBHII *forward* e *reverso* **CATTACACCTCAGCA**ATGGCCAAGAAGCTTTCATCACCGCCGCG e **GTCCCGTGCCGGTTA**TTAGAAGGGCGGGTTGGCGTTGGTGAGCA) para a amplificação de cada gene de interesse. Os oligonucleotídeos foram utilizados para amplificação dos genes alvos de *Thermothelomyces thermophilus* M77. As regiões em negrito são caudas adicionadas para ocorrer pareamento com as regiões complementares do vetor de expressão (pEXPYR) e possibilitar, pela técnica de Gibson Assembly®, a construção do plasmídeo contendo vetor de expressão e gene alvo conectados em posições corretas.

[058] A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utiliza a enzima DNA polimerase *PhusionTM* (New England BioLabs®) e as condições das reações de PCR estão de acordo com a Tabela 1, e foram utilizados 25 ciclos para a reação, sendo que o ciclo foi baseado em 98 °C por 10 s, 68 °C por 30 s, 72 °C por 1 min e 72 °C por mais 5 min. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) para confirmação do tamanho do fragmento amplificado.

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação de PCR para

amplificação gênica.

REAGENTES	VOLUME (μl)
DNAg	1
Primer Forward	2
Primer Reverse	2
dNTPs	2
DMSO	2
MgCl₂	0,5
DNA pol.	0,5
Tampão	10
Água Milliq	30

[059] O vetor pEXPYR foi utilizado para a super-expressão e secreção da proteína de interesse no fungo filamentoso *A. nidulans* A773. Características importantes do vetor são que contém marcas de seleção que conferem resistência à ampicilina (AMP) e zeocina (ZEO), promotor da glucoamilase de *A. niger* (glaAP) para indução da expressão gênica por maltose, seguido por uma região N-terminal, que contém o peptídeo sinal e o terminador triptofano (trpCt). Além disso, o vetor contém uma marca de reversão de auxotrofia composta pelo gene que codifica a orotidina-5'-monofosfato descarboxilase (pyrG) de *A. niger*. Esta enzima é fundamental para a biossíntese de pirimidinas e a presença deste gene no vetor é utilizado para reverter a linhagem auxotrófica de *A. nidulans* A773 (pyrG-). Foi necessária a amplificação do vetor pEXPYR por meio da técnica de PCR para o aumento do número de cópias e prosseguir para a etapa de construção do plasmídeo.

[060] Os fragmentos obtidos pelo PCR foram clonados no

vetor de expressão pEXPYR pela técnica de *Gibson Assembly*® que é uma técnica de alta eficiência utilizada para agrupar vários fragmentos de DNA. Nesta etapa três atividades enzimáticas ocorrem simultaneamente: a 5' exonuclease, capaz de retirar bases nitrogenadas da extremidade 5' e expor as regiões complementares para pareamento por complementariedade entre o fragmento do gene e do vetor; a DNA polimerase, que preenche os espaços vazios de complementaridade; e DNA ligase, conectando os fragmentos de DNA por ligações covalentes e finalizando o processo. Logo, 10 μ l do *Gibson Assembly*® Master Mix foram adicionados a 100 ng do vetor pEXPYR e 300 ng do gene alvo e incubados por 1 h a 50 °C. Após, foram inseridos em célula bacteriana quimiocompetente *E. coli* Turbo pela técnica de choque térmico, em que 10 ng de plasmídeo obtido na etapa anterior foram adicionados a célula bacteriana. Mais precisamente, as células de *E. coli* Turbo em 100 μ L de meio SOC (20 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 20 mM de MgCl₂ e 20 mM de glicose) foram descongeladas em banho de gelo e misturadas com 10 ng do produto da reação do *Gibson Assembly*® (aprox. 11 μ l do plasmídeo), em que foi mantida em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, foi submetida ao choque térmico em banho-maria a 42 °C por 45 segundos. As células foram imediatamente transferidas para o banho de gelo por mais 2 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 ml de meio SOC e foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação de 200 rpm. Após, o cultivo foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto e o excesso de sobrenadante foi descartado. A amostra remanescente (aprox. 100 μ l) foi transferida para placas de Petri contendo meio

LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, 2% de ágar e ajustou-se o pH para 7,0) sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina. Por fim, as placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C. As colônias que cresceram no meio de seleção foram submetidas ao PCR de colônia.

[061] O PCR de colônia é realizado pela suspensão de uma colônia isolada em 10 µl de água destilada, e 1 µl adicionado à reação de PCR contendo os oligonucleotídeos específicos para a amplificação do gene alvo. Somente uma etapa inicial e adicional durante a PCR é necessária para promover o rompimento da membrana bacteriana por aquecimento a 95 °C por 5 minutos, e promover a liberação do DNA plasmidial para a solução de reação e, assim, a reação de PCR ocorreu como descrito anteriormente.

[062] As colônias bacterianas que foram confirmadas com DNA plasmidial contendo o gene de interesse (colônias positivas) no PCR de colônia foram reservadas e um volume de 9 µl da suspensão celular foi inoculado em 10 ml de meio LB líquido (contendo 100 µg/ml de ampicilina) e cultivado por 16 horas a 200 rpm e 37 °C. Após, as células foram submetidas a centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O precipitado de células formado foi submetido à extração e purificação dos plasmídeos utilizando-se o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) seguindo as especificações do fabricante.

[063] A concentração do DNA plasmidial obtida para cada gene (CBHI, CBHII e CDHB) foi quantificada em espectrofotômetro de nano volume e 10 µg foram utilizados para transformar o fungo *Aspergillus nidulans*, linhagem A773. Mais especificamente, os esporos do fungo *A. nidulans*

A773 foram tratados enzimaticamente (Lisozima da clara do ovo e enzima de lise de *Trichoderma harzianum* obtidas da Sigma-Aldrich, número de catálogo: L4919 e L1412, respectivamente), por um período de 3 horas a 30 °C a 100 rpm em solução DSPS (1,1M KCl; 0,1M ácido cítrico, pH 5,8 ajustados com 1M KOH e esterilizado por filtração). O produto foi filtrado em membrana qualitativa do tipo Miracloth (MerckMillipore) e os protoplastos foram obtidos. Seguiu-se para a etapa que consistiu na lavagem dos protoplastos com uma solução STC50 (1.2 M sorbitol, 50 mM CaCl₂ e 50 mM Tris-HCl pH 7,5) e centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos (esta parte do processo foi repetida 3 vezes). Por fim, o DNA de interesse foi adicionado aos protoplastos (aproximadamente 5 µg em 100 µl da suspensão de protoplastos a uma concentração de entre 10⁶ e 10⁸ protoplastos/ml) e a amostra foi mantida em gelo por 20 minutos. Após este período, foram adicionados a mistura, 2 ml de uma solução de polietilenoglicol 4000 25% (PEG) em STC50 e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, seguida pela transferência em meio de seleção (meio mínimo adicionado de sorbitol (1,2M) e piridoxina (10 mg/L).

[064] Os fungos transformantes obtidos passaram por um processo de seleção para verificar a expressão de cada uma das proteínas de interesse (CBHI, CBHII e CDH). A metodologia de seleção consistiu no inóculo de, por volta de, 10 (dez) transformantes obtidos a partir de cada de gene em 10 ml de meio indutor (meio mínimo adicionado de piridoxina (10 mg/L e maltose 3-5% (p/v)). Os inóculos (10⁶ a 10⁸ esporos) foram realizados em placas de Petri (60 x 15 mm) contendo 15 ml do meio mencionado anteriormente e foram mantidas de modo

estacionário a 37 °C por 48 horas. Após este período, os micélios foram removidos com uma espátula e 2 ml do sobrenadante foram concentrados até um volume de 100 µl em um sistema de ultrafiltração (Vivaspin 500) com uma membrana de corte de 5 kDa. O extrato concentrado foi analisado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e os transformantes super expressando e secretando as proteínas de interesse (com tamanho semelhante ao predito pela bioinformática de CBHI com 54 kDa, CBHII com 50 kDa e CDH com 85 kDa) foram selecionados. Assim, um transformante para cada enzima de interesse foi escolhido para as próximas etapas que contaram com a expressão e purificação das proteínas em maior escala. Posteriormente, as bandas de interesse do gel foram excisadas e analisadas em um espectrômetro de massas que é capaz de medir a relação massa/carga de peptídeos e deste modo confirmar a identidade da proteína observada no gel de poliacrilamida. As três enzimas de interesse (CBHI, CBHII e CDHB) foram confirmadas, segundo o critério padrão estabelecido para evitar falsos positivos, com mais de 20% de cobertura da sequência e no mínimo 2 peptídeos identificados.

[065] A expressão das proteínas de interesse em uma maior escala, foi realizada através do cultivo dos fungos recombinantes em placas de Petri contendo meio mínimo adicionado de piridoxina (10 mg/L) por 48-72 horas a 35-37 °C para a obtenção dos esporos. Após, esporos de três placas para cada uma das proteínas de interesse, foram raspados com uma espátula e transferidos para meio mínimo líquido, adicionado de piridoxina e do indutor maltose 2-5% (p/v). O meio foi mantido estacionário por 48-72 horas a 35-37 °C, foi

filtrado em membrana qualitativa e submetida à ultrafiltração e diálise (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6-7,5), utilizando um concentrador acoplado com uma membrana de poliétersulfona (PES) ou de celulose regenerada, com corte de 10 kDa.

[066] O volume final foi submetido ao processo de purificação por técnicas cromatográficas. Os extratos concentrados foram submetidos a cromatografia de troca aniónica utilizando resina empacotada em uma coluna de bancada do tipo econômica. A resina foi previamente equilibrada com 10-20 ml do tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6-7,5) e a amostra foi inserida na coluna com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, 10-20 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6-7,5) foi utilizado para lavar a resina e remover as proteínas que não sofreram interação com a resina e a lavagem foi seguida pela eluição das proteínas de interesse através de um gradiente de cloreto de sódio que variou de 0,05 a 1 M. As frações coletadas foram avaliadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, técnica que permite a separação de uma mistura de proteínas de acordo com o seu tamanho (em kDa) e as frações contendo a proteína de interesse (de acordo com o tamanho predito e visualmente de proteínas super-expressas) foram submetidas a um próximo passo de purificação.

[067] As frações contendo as proteínas de interesse, selecionadas no processo de cromatografia de troca aniónica foram submetidas a etapa de cromatográfica por exclusão de tamanho. Para isso, uma coluna empacotada com resina foi acoplada a um equipamento FPLC Äkta Pure M25(Cytiva Life Sciences), o qual permite o controle da operação como volume

de fluxo, tempo de corrida, volume de injeção de amostra e facilita a amostragem, uma vez que possui um amostrador que fraciona os picos obtidos no cromatograma de modo a separar as proteínas com alta precisão. A resina foi equilibrada com 2-4 volumes de coluna (VC) com tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6-7,5) e 0,1-2 ml da fração obtida no processo de troca aniónica foi inserida na coluna, as proteínas purificadas foram então utilizadas para os passos de hidrólise (CBHI e CBHII) e oxidação (CDH) do material previamente preparado a partir de biomassa lignocelulósica (celulose).

[068] A proporção de enzima CBHI foi fixada como 100% da reação e este valor foi substituído por porcentagens (em massa) da enzima CBHII (0, 5, 10, 15 e 20%) como ilustra a Figura 2. O conteúdo total de enzimas foi de 2,5-20 mg/g de celulose e o teor de celulose na reação foi de 0,25-2%. As condições de reação foram temperatura constante de 30-55 °C, sob agitação de 500-1000 rpm em bloco de aquecimento com agitação, em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4-7) em 1 ml de reação durante 16-48 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000-13.000 rpm por 1-5 minutos e o sobrenadante foi retirado e o teor de açúcares redutores liberados na reação foram determinados pela técnica colorimétrica que faz uso de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A técnica de DNS consiste na reação do agente oxidante (DNS, cor amarela), em meio alcalino, com a carbonila livre e redutora do açúcar solúvel formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (cor alaranjada/vermelha) com absorção máxima de luz à 540 nm. Assim, é possível determinar a concentração de açúcar redutor liberado no meio reacional pela absorbância detectada em espectrofotômetro e comparado

com a curva padrão previamente realizada com glicose. Mais especificamente, 100 μ l do sobrenadante da reação foram adicionados a 100 μ l da solução de DNS (10 g/L ácido dinitrosalicílico, 10 g/L NaOH, 0,5 g/L sulfito de sódio, 200 g/L tartarato de sódio e potássio e 2g/L fenol) e fervidos (95°C) em banho-seco por 5 min, e depois resfriados em gelo por 5 min. O volume de 100 μ l da reação foi retirado e medida a absorbância em microplaca de 96 poços em espectrofotômetro a 540 nm. O cálculo da concentração de açúcares foi determinado pela comparação com uma curva padrão feita com diferentes concentrações de glicose (0 a 0,2 mg/ml).

[069] Como observado na Figura 2, a melhor configuração para o coquetel de CBHs foi de 80% de CBHI e 20% de CBHII. Assim, seguiu-se com essas condições para determinar o teor de enzima (CBHI + CBHII) com maior eficiência na hidrólise do material (Figura 3).

[070] A reação de hidrólise para determinar o teor total de CBHs (em mg de proteínas totais/g de material celulósico) para a máxima liberação de celobiose foi conduzida com 3 níveis de teor de CBHs (5, 10 e 20 mg/g de substrato). As reações foram conduzidas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 3,0-5,5), mantida em uma temperatura entre 25 e 80 °C durante 72 horas com teor de celulose de 0,25-2%. Amostras foram retiradas nos tempos de 4, 24, 48 e 72 horas, centrifugadas 10.000-13.000 rpm por 1-5 minutos e o sobrenadante foi analisado em relação aos açúcares liberados em HPLC. Observou-se que na condição de 24 horas e 20 mg CBHs/g celulose mais de 80% da celobiose obtida em 72 horas já tinha sido liberada, então optou-se por essas condições

de reação.

[071] Após otimizados os parâmetros de processo de hidrólise do substrato refinado, replicaram-se as condições, porém, na presença da enzima oxidativa CDH. A reação de hidrólise ocorreu como citada anteriormente e, após 24-48 horas de incubação, a reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C durante 5-15 minutos visando a desativação das proteínas CBHI e CBHII. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5-20 minutos, e incubadas entre 20 e 80 °C para estabilização da temperatura por 5-30 minutos. Essa etapa foi realizada a fim de calcular valores de conversão de celobiose em CBA.

[072] Em sequência, a reação oxidativa teve início, adicionando-se a reação 5-50 mg da enzima CDHB por grama de celulose contida no sistema conforme ilustra a Figura 4. A reação foi conduzida em um bloco de aquecimento com agitação entre 20 e 80 °C e 500-1100 rpm por um período de 48-96 horas. As reações foram centrifugadas 10.000-13.000 rpm por 5-15 minutos e os produtos solúveis obtidos foram analisados por cromatografia *High Performance Ion Chromatography* (HPIC). Os controles de produtos não oxidados (glicose e celobiose) foram preparados por uma solução a 10 g/L em tampão acetato de sódio, e o controle do produto oxidado (CBA) foi preparado pela reação de CDH com 10-100 mM de celobiose durante 24-96 horas entre 20 e 80 °C, onde ocorre a conversão total de celobiose à CBA, e foram utilizados para identificar e quantificar os produtos liberados na reação.

[073] A conversão de celulose em celobiose foi de 50-90%, sendo, de celobiose em CBA de 50-80% e de celulose em CBA de 40-70%.

[074] Para demonstrar o potencial da presente invenção, as modalidades elencadas acima serão mais detalhadamente descritas, assim como os resultados obtidos. Cabe ressaltar que a descrição a seguir tem apenas a finalidade de elucidar o entendimento da invenção proposta e revelar, de forma mais detalhada, a concretização da invenção sem limitá-la aos mesmos. Dessa forma, variáveis similares aos exemplos também estão englobadas no escopo da invenção.

EXEMPLOS DE CONCRETIZAÇÃO

Processo de produção de ácidos aldônicos a partir de celulose solúvel

[075] Inicialmente foram selecionados três genes (acesso no GenBank: XM_003660741, XM_003660984 e XM_003664495) do fungo termofílico *Thermothelomyces thermophilus* M77, o qual é um microrganismo de interesse biotecnológico obtido no banco de microrganismos.

[076] Os genes codificam três proteínas, sendo estas: uma exoglucanase do tipo I (CBHI, acesso XP_003660789), uma exoglucanase do tipo II (CBHII, acesso XP_003661032) e uma oxidorredutase ativa em celobiose denominada celobiose desidrogenase (CDHB, acesso XP_003664543). De modo a validar o seu mecanismo de ação, estes foram analisados em bancos de dados disponíveis como o *MycoCosm do Joint Genome Institute* (www.jgi.doe.org) e o *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

[077] O DNA genômico do *T. thermophilus* foi extraído e utilizado para amplificação dos genes de interesse pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos, os fragmentos obtidos no PCR

foram clonados no vetor de expressão pEXPYR pela técnica de Gibson Assembly em que a adição de 3 enzimas conjuntamente (T5 exonuclease, DNA polimerase e DNA ligase) permite a combinação de fragmentos de DNA contendo extremidades complementares entre si e construção do plasmídeo (contendo vetor de expressão e gene) e inseridos em célula bacteriana quimiocompetente (*Escherichia coli*) através do método de choque térmico, permitindo a absorção do plasmídeo solúvel para dentro da célula bacteriana através dos poros da membrana celular. As colônias observadas foram submetidas a uma análise através da técnica de PCR de colônia, utilizando a reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para cada gene e com rompimento da membrana celular por aquecimento (95 °C por 5 min) antes do início dos ciclos da PCR. Aquelas colônias que apresentaram resultado positivo de amplificação do gene de interesse foram selecionadas para crescimento para replicar o material genético.

[078] Mais especificamente, células de *E. coli* contendo o gene da CBHI (XM_003660741), CBHII (XM_003660984) e CDHB (XM_003664495) foram cultivadas em 10 ml de meio LB (1% triptona, 1% NaCl e 0,5% extrato de levedura), adicionado de ampicilina (100 µg/ml) por 18 horas, a 37 °C e 180 rpm. O cultivo resultante foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm e o precipitado de células utilizado para extração dos plasmídeos contendo os genes mencionados utilizando um kit comercial para extração (*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems da Promega*).

[079] A concentração do DNA plasmidial obtido para cada gene (CBHI, CBHII e CDHB), foi quantificado em espectrofotômetro de nano volume (*Nanodrop One C*,

Thermofisher), e 10 µg foram utilizados para transformar o fungo *Aspergillus nidulans*, linhagem A773. A transformação dos protoplastos foi mediada por polietileno glicol (PEG) e realizada conforme descrito anteriormente (Segato et al., 2012). Mais especificamente, micélios de *A. nidulans* A773 geneticamente modificado e deficiente na síntese de pirimidinas (uracila e uridina) e vitamina B6 (piridoxina) foram tratados com coquetel de enzimas (Lisozima da clara do ovo e enzima de lise de *Trichoderma harzianum* obtidas da Sigma-Aldrich, número de catálogo: L4919 e L1412, respectivamente), por um período de 3 horas a 30 °C a 100 rpm em solução DSPS (1,1M KCl; 0,1M ácido cítrico, pH 5,8 ajustados com 1 M KOH e esterilizado por filtração). O produto foi filtrado em membrana qualitativa do tipo *Miracloth* (MerckMillipore) e os protoplastos foram obtidos. Seguiu-se para a etapa que consistiu na lavagem dos protoplastos com uma solução STC50 (1,2 M sorbitol, 50 mM CaCl₂ e 50 mM Tris-HCl pH 7,5) e centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos (esta parte do processo foi repetida 3 vezes). Por fim, o DNA de interesse foi adicionado aos protoplastos (aproximadamente 5 µg em 100 µl da suspensão de protoplastos a uma concentração de entre 10⁶ e 10⁸ protoplastos/ml) e a amostra foi mantida em gelo por 20 minutos. Após este período, foram adicionados à mistura, 2 ml de uma solução de polietilenoglicol 4000 25% (PEG) em STC50 e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, seguida pela transferência em meio de seleção (meio mínimo adicionado de sorbitol (1,2M) e piridoxina (10 mg/L).

[080] Os fungos transformantes obtidos no passo anterior passaram por um processo de seleção para verificar

a expressão de cada uma das proteínas de interesse (CBHI, CBHII e CDH). Nesta etapa, esporos foram inoculados em meio de expressão (meio mínimo contendo 3% (p/v) maltose e 10mg/ml piridoxina) por 48 h a 37°C e, após esse período, a massa micelial foi descartada e o líquido foi concentrado 20x por sistema de ultrafiltração com membrana de corte de 5 kDa. O concentrado foi utilizado para separação de proteínas por tamanho em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e, portanto, identificar a super-expressão da proteína de interesse no tamanho esperado (em torno de 50 kDa para CBHI e CBHII e 85 kDa para CDH). Assim, três transformantes foram escolhidos para as próximas etapas que contaram com a expressão e purificação das proteínas.

[081] A expressão foi realizada através do cultivo dos fungos em placas de Petri contendo meio mínimo adicionado de piridoxina (10 mg/L) por 48 horas a 37 °C. Após, os esporos de três placas para cada uma das proteínas de interesse, foram raspados com uma espátula e transferidos para meio mínimo líquido, adicionado de piridoxina e do indutor maltose 3% (p/v). O meio foi mantido estacionário por 48 horas a 37 °C, foi filtrado em membrana qualitativa e submetida à ultrafiltração e diálise (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5), utilizando um concentrador do tipo *Amicon Stirred Cell* acoplado com uma membrana de poliétersulfona (PES), com corte de 10 kDa. O volume final foi submetido ao processo de purificação por técnicas cromatográficas a seguir.

[082] Os extratos concentrados foram submetidos a cromatografia de troca aniônica utilizando 3 ml de uma resina DEAE-Sepharose CL6B empacotada em uma coluna de bancada do tipo econômica (*Econopack*). A resina foi previamente

equilibrada com 20 ml do tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5) e a amostra foi inserida na coluna com o auxílio de uma pipeta. Após, 10 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5) foram utilizados para lavar a resina e remover as proteínas que não sofreram interação com a resina e a lavagem foi seguida pela eluição das proteínas de interesse através de um gradiente de cloreto de sódio que variou de 0,05 a 1 M. As frações coletadas foram avaliadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% e, as frações contendo a proteína de interesse foram submetidas a um próximo passo de purificação.

[083] As frações contendo as proteínas de interesse, selecionadas no processo de cromatografia de troca aniónica foram submetidas à etapa de cromatográfica por exclusão de tamanho. Para isso, uma coluna empacotada com resina do tipo *Superdex 75* foi acoplada ao *FPLC Äkta Pure M25*. A resina foi equilibrada com 2 volumes de coluna (VC) com tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5) e 0,5 ml da fração obtida no processo de troca iônica foi inserida na coluna.

[084] As proteínas purificadas foram então utilizadas para os passos de hidrólise (CBHI e CBHII) e oxidação (CDH) da polpa de celulose. O material celulósico (celulose com pureza acima de 98,5%) foi previamente hidratado em água destilada (100 g em 1000 ml de água) e mantidos a uma temperatura de 4 °C por 24 horas. A suspensão celulósica foi homogeneizada utilizando um desfibrilador e ultra desfibrilada em ultra refinador de discos *SuperMassColloider Masuko* (posição dos discos -100 µm, rotação de 1600 rpm e 3 % de base seca de concentração de sólidos) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e armazenada a 4 °C para as

posteriores análises. O teor de sólidos foi de 12,25 g/L.

[085] Inicialmente foi realizada uma avaliação sobre a proporção ideal entre as enzimas CBHI e CBHII para o processo de sacarificação da celulose de dissolução desfibrilada. Para isso, a proporção de enzima CBHI foi fixada como 100% da reação e este valor foi substituído por porcentagens (em massa) da enzima CBHII (0,5, 10, 15 e 20%) (Figura 2). O conteúdo total de enzimas foi de 5 mg/g de celulose e o teor de celulose na reação foi de 0,6125%. As condições de reação foram temperatura constante de 50°C, sob agitação de 850 rpm em agitador *ThermoMixer C* (*Eppendorf*), em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) em 1 ml de reação durante 16 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado e o teor de açúcares liberados da reação foram determinados pela técnica colorimétrica de DNS (Miller, 1959), em que o ácido 3,5-dinitrosalicílico (amarelo) é capaz de reagir com as extremidades redutoras do açúcar solúvel e o composto reduzido (laranja/avermelhado) indicar a absorbância, sendo possível realizar o cálculo da concentração de açúcar de acordo com a curva padrão previamente realizada com glicose. Como observado na Figura 2, a melhor configuração para o coquetel de CBHs foi de 80% de CBHI e 20% de CBHII. Seguiu-se com essas condições para determinar o teor de enzima (CBHI + CBHII) com maior eficiência na hidrólise do material (Figura 3).

[086] A reação de hidrólise para determinar o teor total de CBHs (em mg proteínas totais/g de material celulósico) para a máxima liberação de cellobiose foi conduzida com 3 níveis de teor de CBHs (5, 10 e 20 mg/g de

substrato). As reações foram conduzidas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), mantida em uma temperatura de 50°C durante 72 horas com teor de celulose de 0,6125%. Amostras foram retiradas 4, 24, 48 e 72 horas, centrifugadas por 10.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi analisado em relação aos açúcares liberados em HPLC (Waters). Observou-se que em 24 h e 20 mg CBHs/g celulose mais de 80% da cellobiose obtida em 72 horas já tinha sido liberada, então optou-se por essas condições de reação.

[087] Após otimizados os parâmetros de processo de hidrólise do substrato refinado, replicaram-se as condições, porém na presença da enzima oxidativa CDH. A reação de hidrólise ocorreu como citada anteriormente, e após 24 h de incubação, a reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C durante 5 minutos em *ThermoMixer C* (Eppendorf) visando a desativação das proteínas CBHI e CBHII. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos, e incubadas a 50 °C para estabilização da temperatura por 10 minutos. Essa etapa foi realizada a fim de calcular valores de conversão de cellobiose em CBA.

[088] Após, a reação oxidativa teve início, adicionando-se à reação 13 mg CDHB para cada grama de celulose contida no sistema (Figura 4). A reação foi conduzida em um bloco de aquecimento com agitação do tipo *ThermoMixer C* (Eppendorf) a 50°C e 850 rpm por um período de 48 horas. As reações foram centrifugadas 10.000 rpm por 5 minutos e os produtos solúveis obtidos foram analisados por cromatografia utilizando um equipamento de *High Performance Ion Chromatography* (HPIC, ICS 5000, Dionex) utilizando uma coluna CarboPacTM PA1 (4 x 250 mm) e acoplado a uma pré-

coluna *CarboPacTM* (4 x 50 mm). Os controles de produtos não oxidados (glicose e cellobiose) foram preparados a 10 g/L solubilizados em tampão acetato de sódio, e o controle do produto oxidado (CBA) foi preparado pela reação de CDH com 30 mM de cellobiose durante 24 horas a 50 °C, em que ocorre a conversão total de cellobiose à CBA, e foram utilizados para identificar e quantificar os produtos liberados na reação. A conversão de celulose em cellobiose foi de 87,2%, de cellobiose em CBA de 76,4% e de celulose em CBA de 66,5%.

[089] A presente metodologia apresenta baixos níveis de contaminação da reação pelo uso de temperaturas elevadas (50 °C) e biocatalisadores termoestáveis (CBHI, CBHII e CDHB provenientes do fungo termofílico *T. thermophilus*), o que possibilita reações com temperaturas mais elevadas, promovendo o aumento da produtividade sem afetar as enzimas do sistema.

[090] O coquetel enzimático desenvolvido não necessita da adição de cofatores (como NADP) ou mediadores, sobressaindo-se quando comparado a processos contínuos de reoxidação da CDH que fazem uso da enzima lacase e necessita de mediadores redox, sendo uma nas etapas de purificação, pois requer purificações menos rigorosas (*downstream*), uma vez que os mediadores redox apresentam toxicidade.

[091] A tecnologia do processo é relativamente rápida (48 horas) em comparação com fermentação fúngica (>160 horas) e possibilita a recuperação do produto em forma de ácido ao invés de seu sal. O meio reacional é composto somente por soluções simples (sais, água e celulose), sendo uma vantagem frente a complexidade dos meios utilizados nos processos de produção por cultivo de bactérias que necessitam de meio de

cultivo complexo contendo extrato de carne, extrato de levedura, triptona, peptona e alguns sais. Não ocorre formação de produtos metabólicos secundários de células cultivadas que podem encarecer o processo de purificação do CBA, utilizando técnicas avançadas e custosas de ultra filtração e cromatografia. Apresentando níveis de rendimento do processo de 66,5% (conversão celulose em CBA, Figura 4).

[092] O CBA se apresenta como um potencial substituinte do LBA na indústria farmacêutica, de cosméticos e alimentos, pois o LBA é um composto derivado da lactose, a qual é um composto de origem animal (leite), enquanto a celobiose (precursaora do CBA) tem origem em composto renovável vegetal (celulose obtida de compostos lignocelulósicos, como o bagaço e palha de cana-de-açúcar, subproduto da indústria sucro-alcooleira, ou da indústria de papel e celulose, e largamente produzida). Devido à alta similaridade estrutural entre o LBA e o CBA, as vias de aplicação se mantêm similares, apresentando um processo de substituição passível e desejável (Figura 1A e 1B).

Processo de produção de ácidos aldônicos com adição da enzima oxidativa CDHB juntamente com o coquetel de celulases

[093] Em vista do processo simplificado proposto pela presente invenção, também foi preliminarmente testada a adição da enzima oxidativa CDHB juntamente com o coquetel de celulases CBHI e CBHII (Figura 6). Para este processo, foram utilizadas as mesmas condições previamente descritas com etapas separadas, porém as 3 enzimas foram adicionadas a celulose solúvel conjuntamente: o material foi submetido simultaneamente ao processo de hidrólise pelas enzimas CBHI e CBHII e oxidativo pela CDHB e esta foi mantida por um tempo

total de 48 h (final da reação) à temperatura constante de 50°C e pH 5,0. Foi observada uma rápida formação de CBA de 3,5 g/L em 6 horas de reação e uma menor taxa de conversão até 24 horas de reação, atingindo o máximo de concentração de CBA de 4,12 g/L.

[094] O acúmulo de celobiose foi de 1,5 g/L e de glicose 0,5 g/L. Esse sistema também se mostrou bastante eficiente e pode ser utilizado como alternativa para aplicação industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[095] Baminger, U., Ludwig, R., Galhaup, C., Leitner, C., Kulbe, K.D., Haltrich, D., 2001. Continuous enzymatic regeneration of redox mediators used in biotransformation reactions employing flavoproteins. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 11, 541-550. [https://doi.org/10.1016/S13811177\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S13811177(00)00034-5)

[096] Besson, M., Lahmer, F., Gallezot, P., Fuertes, patrick, Fleche, G., 1995. Catalytic oxidation of glucose on bismuth-promoted palladium catalysts. *J. Catal.* <https://doi.org/10.1006/jcat.1995.1065>

[097] Climent, M.J., Corma, A., Iborra, S., 2011. Converting carbohydrates to bulk chemicals and fine chemicals over heterogeneous catalysts. *Green Chem.* 13, 520-540. <https://doi.org/10.1039/c0gc00639d>

[098] Du, G., Liu, L., Chen, J., 2015. White Biotechnology for Organic Acids, Industrial Biorefineries and White Biotechnology. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00013-6>

[099] Escandar, G.M., Sala, L.F., Gonzalez Sierra, M., 1991. Complexes of cobalt(II) and nickel(II) with d-aldonic and d-alduronic acids in aqueous solution. *Can. J. Chem.* 13,

143-150. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(00\)86650-4](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(00)86650-4)

[100] Fähnrich, P., Irrgang, K., 1982. Conversion of cellulose to sugars and cellobionic acid by the extracellular enzyme system of *Chaetomium cellulolyticum*. *Biotechnol. Lett.* 4, 775-780.

[101] Fischer, K., Bipp, H.P., 2002. Removal of heavy metals from soil components and soils by natural chelating agents. Part II. Soil extraction by sugar acids. *Water. Air. Soil Pollut.* 138, 271-288.

<https://doi.org/10.1023/A:1015566207849>

[102] Frush, H., 1963. HSI: Lactonization of aldonic acids. *Methods Carbohydr Chem* 13-14.

[103] Governo, A.T., Proença, L., Parpot, P., Lopes, M.I.S., Fonseca, I.T.E., 2004. Electro-oxidation of D-xylose on platinum and gold electrodes in alkaline medium. *Electrochim. Acta* 49, 1535- 1545.

<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2003.11.013>

[104] Haffenden, L.J.W., Yaylayan, V.A., 2008. Nonvolatile oxidation products of glucose in maillard model systems: Formation of saccharinic and aldonic acids and their corresponding lactones. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1638-1643.

<https://doi.org/10.1021/jf073290c>

[105] Hildebrand, A., Kasuga, T., Fan, Z., 2015. Production of cellobionate from cellulose using an engineered *Neurospora crassa* strain with laccase and redox mediator addition. *PLoS One* 10, 1-12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123006>

[106] Isbell, H.S., Frush, H.L., 1931. The oxidation of sugars. I. The electrolytic oxidation of aldose sugars in the presence of a bromide and calcium carbonate. *Bur. Stand.*

- J. Res. 6, 1145. <https://doi.org/10.6028/jres.006.070>
- [107] Isbell, H.S., Frush, H.L., Bates, F.J., 1932. Manufacture of Calcium Gluconate by Electrolytic Oxidation of Dextrose. Ind. Eng. Chem. 24, 375-378. <https://doi.org/10.1021/ie50268a003>
- [108] Kiryu, T., Kiso, T., Nakano, H., Murakami, H., 2015. Lactobionic and cellobionic acid production profiles of the resting cells of acetic acid bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. 79, 1712-1718. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1038214>
- [109] Lemeune, S., Barbe, J.M., Trichet, A., Guilard, R., 2000. Degradation of cellulose models during an ozone treatment. Ozonation of glucose and cellobiose with oxygen or nitrogen as carrier gas at different pH. Ozone Sci. Eng. 22, 447-460. <https://doi.org/10.1080/01919510009408789>
- [110] Li, X., Chomvong, K., Yu, V.Y., Liang, J.M., Lin, Y., Cate, J.H.D., 2015. Cellobionic acid utilization: From *Neurospora crassa* to *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Biofuels 8, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0303-2>
- [111] Ludwig, R., Ozga, M., Zámocky, M., Peterbauer, C., Kulbe, K.D., Haltrich, D., 2004. Continuous enzymatic regeneration of electron acceptors used by flavoenzymes: Cellobiose dehydrogenase-catalyzed production of labtobionic acid as an example. Biocatal. Biotransformation 22, 97-104. <https://doi.org/10.1080/10242420410001692787>
- [112] Mao, S., Liu, Y., Hou, Y., Ma, X., Yang, J., Han, H., Wu, J., Jia, L., Qin, H., Lu, F., 2018. Efficient production of sugar-derived aldonic acids by *Pseudomonas fragi* TCCC11892. RSC Adv. 8, 39897-39901. <https://doi.org/10.1039/C8RA07556E>

[113] Mehtio, T., Toivari, M., Wiebe, M.G., Harlin, A., Penttilä, M., Koivula, A., 2016. Production and applications of carbohydrate-derived sugar acids as generic biobased chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 904–916. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1060189>

[114] Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 21, 426–428.

[115] Moe, S.T., Holen, A.K., Schult, T., 2002. 4-O- β -D-glucopyranosyl-D-gluconic acid (cellobionic acid) produced by ozonation of cellobiose: Isolation by HPLC and assignment of NMR chemical shifts. *J. Carbohydr. Chem.* 21, 513–520. <https://doi.org/10.1081/CAR-120016850>

[116] Nakano, H., Kiryu, T., Kiso, T., Murakami, H., 2006. Lactobionic acid and its biocatalytic production. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 211(10), 874.

[117] Nouaille, R., Matulova, M., Pätoprsty, V., Delort, A.M., Forano, E., 2009. Production of oligosaccharides and cellobionic acid by *Fibrobacter succinogenes* S85 growing on sugars, cellulose and wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 425–433. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1884-0>

[118] Oh, Y.-R., Song, J.K., Eom, G. tae, 2022. Efficient production of cellobionic acid using whole-cell biocatalyst of genetically modified *Pseudomonas taetrolens*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 45, 1057–1064. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02725-9>

[119] Parpot, P., Muiuane, V.P., Defontaine, V., Bettencourt, A.P., 2010. Electrocatalytic oxidation of readily available disaccharides in alkaline medium at gold

- electrode. *Electrochim. Acta* 55, 3157-3163.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.12.087>
- [120] Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., Branduardi, P., 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 26, 100-108.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.11.006>
- [121] Vedovato, V., Vanbroekhoven, K., Pant, D., Helsen, J., 2020. Electrosynthesis of Biobased Chemicals Using Carbohydrates as a Feedstock. *Molecule* 25, 3712.
<https://doi.org/10.3390/molecules25163712>
- [122] Yang, B., Montgomery, R., 2005. Oxidation of lactose with bromine. *Carbohydr. Res.* 340, 2698- 2705.
- [123] Yoo, Y., Oh, Y.-R., Eom, G.T., 2022. Valorization of cellulose in waste paper into value-added cellobionic acid by genetically engineered *Pseudomonas taetrolens*. *Ind. Crops Prod.* 186, 115186.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115186>
- [124] Yu, R., Scott, E.J. Van, 2004. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *J. Cosmet. Dermatol.* 3, 76-87.
- [125] Yu, R.J., Scott, E.J. Van, 2008. Oligosaccharide aldonic acids and their topical use. United States - Pat. Appl. Publ. US 2004/0180854A1.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de ácido celobiônico (CBA) a partir de material de celulose ou lignocelulose, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a. Obtenção de esporos e produção das enzimas CBHI, CBHII e CDHB;
- b. Purificação das enzimas CBHI, CBHII e CDHB, e obtenção de um coquetel de enzimas CBHI e CBHII purificadas, e obtenção de CDHB purificada;
- c. Homogeneização da celulose ou lignocelulose até obtenção de uma solução de celulose ou lignocelulose;
- d. Hidrólise enzimática da celulose ou lignocelulose obtida em (c) com o coquetel de CBHI e CBHII purificadas obtidas em (b); e
- e. Oxidação enzimática da celulose ou lignocelulose obtida em (d) a ácido celobiônico, com a enzima CDHB purificada.

2. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o material de celulose ou lignocelulose é obtido de resíduos industriais, e é selecionado dentre: bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de milho e subprodutos da indústria sucro-alcooleira ou da indústria de papel e celulose, biomassa lignocelulósica, resíduo lignocelulósico da agroindústria ou da indústria de papel e celulose.

3. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o material de celulose ou lignocelulose foi previamente hidratado com água destilada e mantido a uma

temperatura de 4 a 16 °C por 24-96 horas.

4. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, na etapa (d), a solução de celulose ou lignocelulose foi homogeneizada utilizando um desfibrilador e foi ainda ultra desfibrilada em ultra refinador de discos.

5. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o posicionamento dos discos foi estabelecido para 100 µm, rotação de 1600 rpm e 3 % de base seca de concentração de sólidos, em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e armazenada a 4 °C.

6. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (a) foram inicialmente selecionados três genes do fungo termofílico *Thermothelomyces thermophilus* M77 cujo acesso no GenBank é XM_003660741, XM_003660984 e XM_003664495), em que os referidos genes codificam as seguintes proteínas: exoglucanase do tipo I (CBHI), acesso XP_003660789; exoglucanase do tipo II (CBHII), acesso XP_003661032; e oxidorredutase ativa em celobiose denominada celobiose desidrogenase (CDHB), acesso XP_003664543.

7. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o DNA genômico de *T. thermophilus* foi extraído e utilizado para amplificar os genes pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e os fragmentos obtidos pelo PCR foram克lonados no vetor de expressão pEXPYR e inseridos em célula bacteriana quimiocompetente de *Escherichia coli* linhagem Turbo.

8. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que as células de *E. coli* contendo o gene da CBHI (XM_003660741), CBHII (XM_003660984) e CDHB (XM_003664495) foram cultivadas, centrifugadas e o precipitado de células foi utilizado para extração de plasmídeos contendo os genes.

9. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, caracterizado pelo fato de que a concentração do DNA plasmidial obtida para cada gene (CBHI, CBHII e CDHB) foi quantificada e 10 µg foram utilizados para transformar o fungo *Aspergillus nidulans*, linhagem A773.

10. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, caracterizado pelo fato de que a expressão das proteínas foi realizada através do cultivo dos fungos contendo meio mínimo adicionado de piridoxina (10 mg/L) por 48-96 horas a 30-37 °C, em seguida, os esporos foram raspados com uma espátula e transferidos para meio mínimo líquido, adicionado de piridoxina e do indutor maltose (2-10%), o meio foi mantido estacionário por 24-96 horas a 30-37°C, foi filtrado em membrana qualitativa e submetida à ultrafiltração e diálise com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6-7,5, utilizando um concentrador acoplado com uma membrana de poliétersulfona.

11. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, para reações de hidrólise e oxidação, a proporção de enzima CBHI foi fixada como 100% da reação e este valor foi substituído por porcentagens em massa da enzima CBHII 0, 5, 10, 15 e 20%.

12. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o conteúdo total de enzimas foi de 2-30 mg/g de celulose e o teor de celulose na reação foi de 0,1-2%.

13. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as condições de reação durante todo o processo de hidrólise da celulose foram temperatura constante 40-55 °C, sob agitação de 850-1100 rpm em agitador, em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4-5,5) em 0,1-2 ml de reação durante 16-48 horas.

14. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a melhor configuração para o coquetel de CBHI e CBHII purificadas obtidas após a etapa (b), para a etapa de hidrólise (d) foi de 80% de CBHI e 20% de CBHII.

15. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a reação de hidrólise da etapa (d) foi conduzida em tampão acetato de sódio 50 mM (pH entre 3,0 e 5,5), mantida em temperatura entre 25 e 80°C durante 72-96 h com teor de celulose de 0,1-2%.

16. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que em 24-96 h e 5-40 mg CBHs/g celulose, mais de 50% de celobiose obtida em 24-96 horas é liberada.

17. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que após 24 horas de incubação da reação de hidrólise da etapa (d), a reação é interrompida por aquecimento a 100 °C

durante 5 minutos para desativar as proteínas CBHI e CBHII, com posterior banho de gelo por 5-20 minutos, e incubação entre 20 e 80 °C para estabilizar a temperatura por 5-20 minutos e iniciar a reação oxidativa.

18. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que 1-30 mg da enzima CDHB são adicionados à reação, que ocorre em um bloco de aquecimento com agitação entre 20 e 80 °C e 850-1100 rpm por um período de 24-96 horas.

19. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a conversão de celulose em celobiose é de 50-100%, de celobiose em CBA de 50-100% e de celulose em CBA de 50-100%.

20. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido processo compreende, opcionalmente, a adição da enzima oxidativa CDHB juntamente com as enzimas CBHI e CBHII à solução de celulose ou lignocelulose, em que o material é submetido simultaneamente ao processo de hidrólise pelas enzimas CBHI e CBHII e oxidação pela CDHB, sendo mantido por um tempo total de 48 h à temperatura constante de 50°C e pH 5,0.

21. Processo de produção de ácido celobiônico, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que obtém rápida formação de CBA de 3,5 g/L em 6 horas de reação, menor taxa de conversão até 24 horas de reação, atinge o máximo de concentração de CBA de 4,12 g/L e acúmulo de celobiose de 1,5 g/L e de glicose 0,5 g/L.

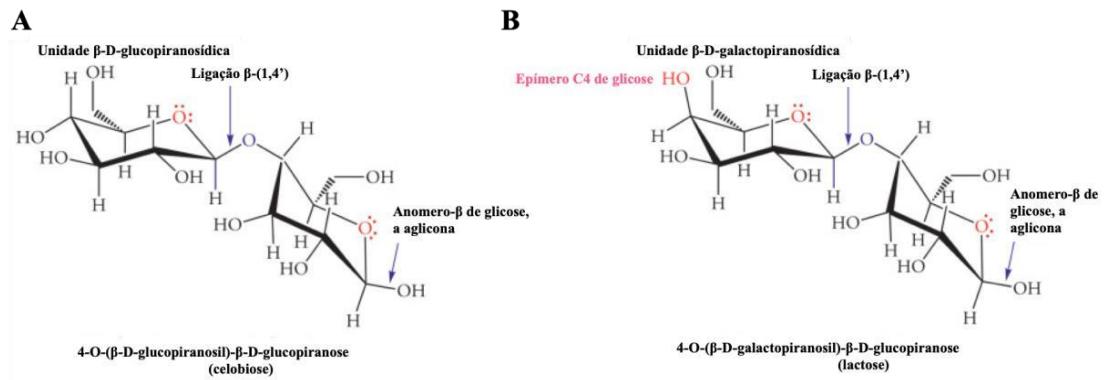


FIGURA 1

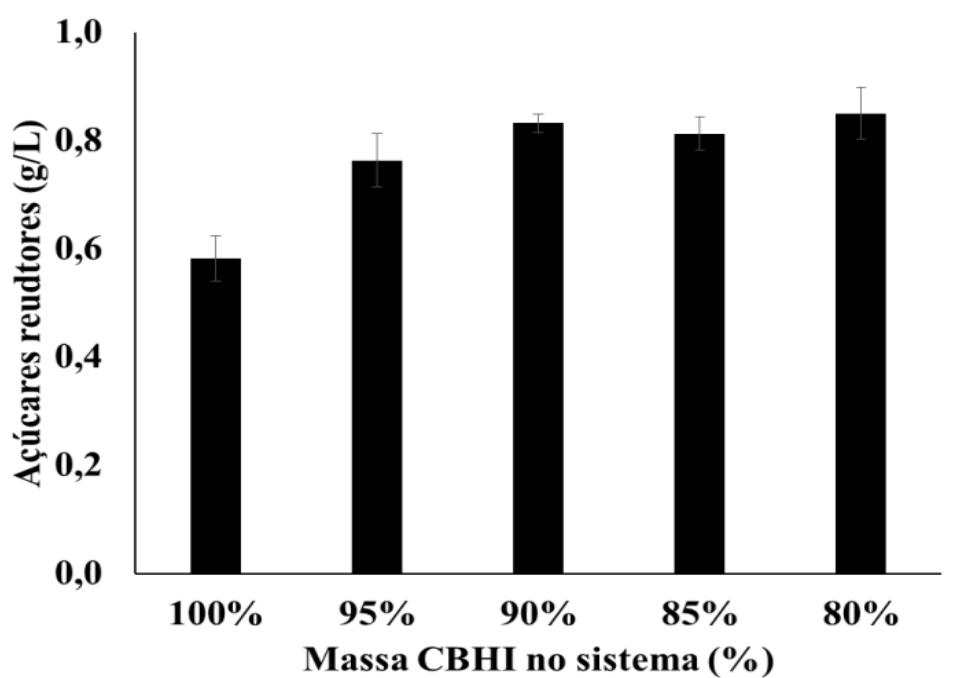


FIGURA 2

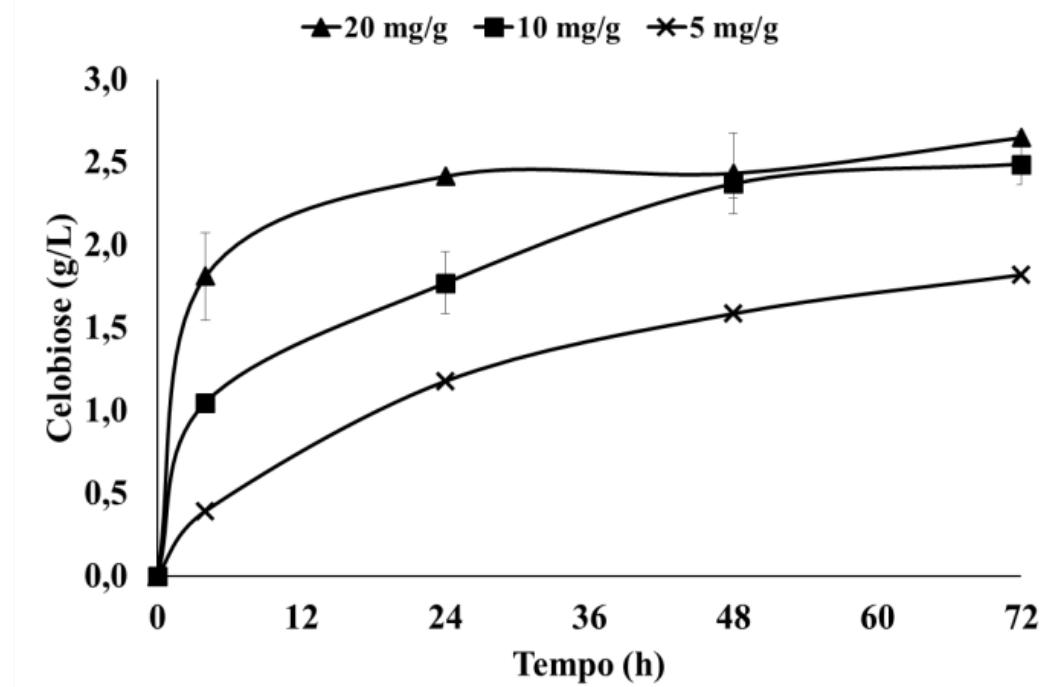


FIGURA 3

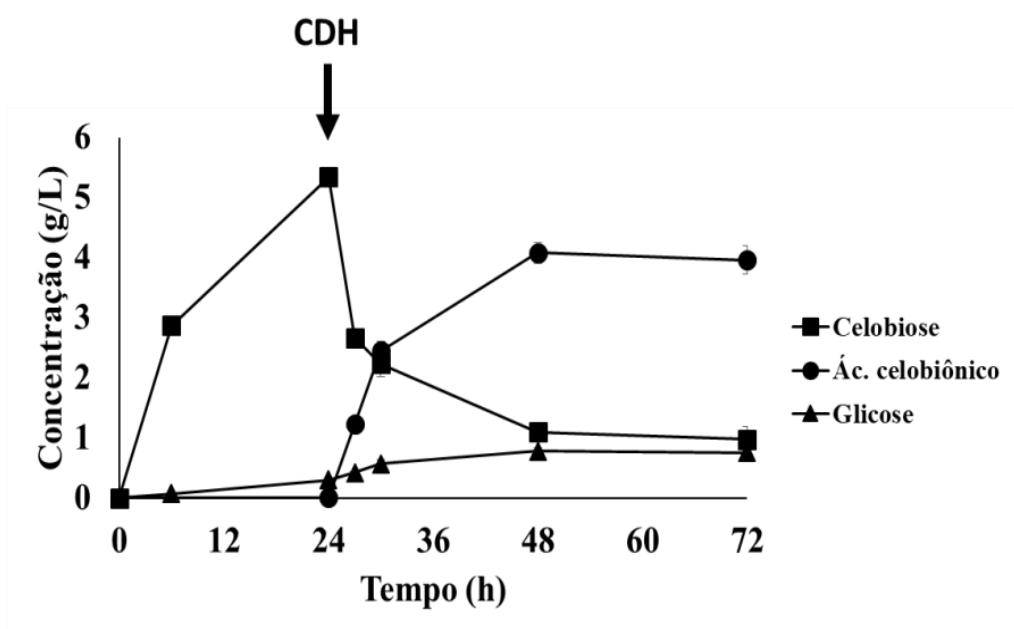


FIGURA 4

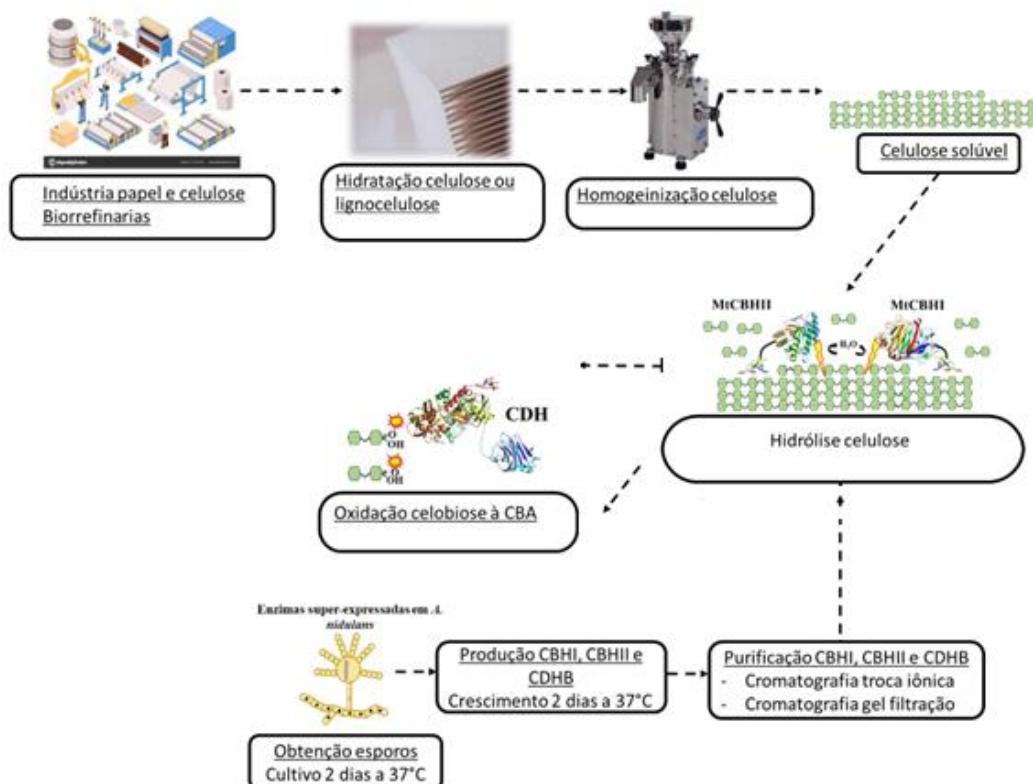


FIGURA 5

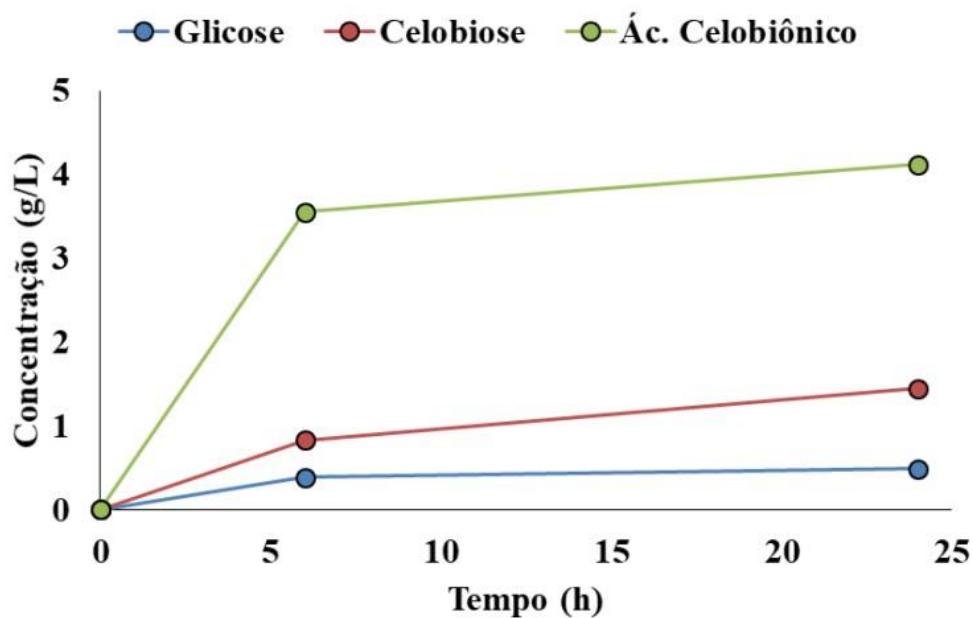


FIGURA 6

RESUMO**PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CELOBIÔNICO (CBA) A PARTIR
DE MATERIAL DE CELULOSE OU LIGNOCELULOSE**

A presente invenção refere-se à produção de ácidos aldônicos, mais precisamente de ácido celobiônico, a partir de matéria-prima renovável de origem não animal, desfibrilada em ultra refinador de discos. A polpa de celulose desfibrilada foi utilizada como substrato para alimentar o sistema de produção de ácido celobiônico por via enzimática. Tal sistema é constituído por duas etapas: (i) ação de um conjunto de enzimas hidrolíticas com atividade de exoglucanase do tipo I e II (celobiohidrolases, CBHI e CBHII), com ação sobre as cadeias de celulose, resultando como produto principal, unidades de celobiose; (ii) pela adição ao sistema da oxidorredutase celobiose desidrogenase (CDH), a qual tem como mecanismo de ação a capacidade de oxidar as moléculas de celobiose, previamente produzidas pelas CBHs, convertendo este carboidrato em ácido aldônico. O referido sistema também permite a produção de ácidos apresentando cadeias de maior grau de polimerização. A presente invenção pode ser aplicada na área de cosméticos (como parte da formulação de produtos tópicos com origem vegana), nanotecnologia (liberação controlada de fármacos), em alimentos (controle biológico de contaminantes) e na área médica e hospitalar (estabilização de órgãos a serem transplantados).