



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 016930 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Resumo: Trata a presente invenção de um processo para produção de enzimas xilanases via fermentação em estado líquido utilizando resíduos lignocelulósicos, com ou sem a presença de amidos, pré-tratados ou não, podendo ser complementado com sacarose e sais de baixo custo, via fermentação submersa com fungos lignocelulolíticos, sem modificação genética, que provê um extrato enzimático capaz de hidrolisar a hemicelulose, atingindo valores de produção de xilanase fúngica superiores ao estado da técnica e potencialmente útil nas empresas de papel e celulose, produção de etanol de segunda geração, produção de pré-bióticos, nutrição animal, clarificação de sucos, extração de óleo vegetal, entre outros.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Renan Padron Almeida

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 33778301896

Endereço: Rua Joaquim Antunes 819

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05415012

Telefone: 1156270570

Fax:

Email: renan.padron@unesp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: ANA FLÁVIA AZEVEDO CARVALHO

CPF: 01238189660

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Prado Kelly no. 389 - V. Tennis Clube

Cidade: Assis

Estado: SP

CEP: 19806-380

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Inventor 2 de 5

Nome: DOUGLAS FERNANDES DA SILVA

CPF: 31138722863

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua João Binato, 40 - Santa Rita

Cidade: Assis

Estado: SP

CEP: 19807-543

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Inventor 3 de 5

Nome: LUDMILA MELO HERGESEL

CPF: 41908667842

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Augusto Lippel, 1900, ap. 93, Bloco A - Bairro Parque Campolim

Cidade: Sorocaba

Estado: SP

CEP: 18048-130

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Inventor 4 de 5

Nome: PEDRO DE OLIVA NETO

CPF: 04582812805

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Prado Kely, 389 - Vila Tênis Clube

Cidade: Assis

Estado: SP

CEP: 19806-380

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Inventor 5 de 5

Nome: TANIA SILA CAMPIONI

CPF: 35633849833

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Sílvio Bombonati, 881 - Vila Tênis Clube

Cidade: Assis

Estado: SP

CEP: 19806-281

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: auin.pi@unesp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	FUNDUNESP GRU DEPÓSITO 8.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU 8 DEPÓSITO 492880.pdf
Procuração	Proc e Posse 07-2018.pdf
Documento de Cessão	Termo de Cessão.pdf
Declaração Negativa de Acesso	Declaração Negativa Cgen.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002549-6

DETALHE DO COMPROMISSO

Convênio: 0033-0239-004900019792 **Conta de Débito:** 0239-000430023105

Tipo de Pagamento: BLQ Outros

Código de Barras: 00190000090294091618806492880171175990000007000

No. compromisso banco: 1028079000200009 **No. compromisso cliente:** 492880/DS1 1011

Nome/Razão Social do Beneficiário Original: 000009853INPI - INST. NACIONAL

Nome/Razão Social do Pagador Efetivo: FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENT

CPF/CNPJ do Pagador Efetivo: 57.394.652/0001-75

Valor Nominal: 70,00

Desc./ Abat.: 0,00 **Juros:** 0,00

Data de Vencimento: 25/07/2018

Data de Pagamento: 25/07/2018

Situação: Efetivado

No. Lista de Débito: **No. Protocolo:** PGTFORNB25072018900130273

Autenticação: 11CBC4E1B1DDAE4EB3E01AB

Valor a Pagar: 70,00[retornar](#)**Central de Atendimento
Santander Empresarial**4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)**SAC 0800 762 7777
Ouvidoria 0800 726 0322**[imprimir](#)

PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento,

a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua,

nomeia e constitui seu procurador, **RENAN PADRON ALMEIDA**, brasileiro, portador do RG nº 43.746.608-5, SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 337.783.018/96,

outorgando-lhe poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI e outras instituições competentes, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de

Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP: 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópias, termos de cessão de direitos, termos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade intelectual, incluindo, mas não se limitando, aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou de licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado

todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

São Paulo, 16 de julho de 2018.



UNESP

pl Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Reitor

SERGIO ROBERTO NOBRE
VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA

9.º TABELÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 124 - 9º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3258-2011 - Fax: (11) 2174-6858
www.nopcartorio.com.br

Reconheço a 1 firma com valor econômico por semelhança de SERGIO ROBERTO NOBRE, do que dou fé.

Em tesº da verdade.

São Paulo/Capital, 24 de julho de 2018. Valor recebido R\$ 9,25
Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba

ANDREI BARRETO DA SILVA



Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP: 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

Termo de Posse e Compromisso do Professor Doutor Sandro Roberto Valentini como Reitor da UNESP

Quis dezasseis dias do mês de janeiro de dois mil e dezessete, às catorze horas e trinta minutos, no Teatro Santander, São Paulo, em sessão pública e solene do Conselho Universitário, o Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, por este ato, toma posse na função de Reitor da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com mandato de quatro anos, a contar de 15 de janeiro de 2017, conforme Decreto de nomeação de 28.11.2016, do excelentíssimo senhor Geraldo Alckmin, Governador do Estado de São Paulo, publicado no Diário Oficial do Estado de 29 de novembro de 2016 e retificado conforme publicação de 22 de dezembro de 2016. Na oportunidade, o empossado assume o compromisso de cumprir e fazer cumprir o Estatuto, o Regimento Geral e a legislação da UNESP, bem como as leis maiores do ensino no país. Para constar, foi elaborado o presente termo, assinado pelo Professor Doutor Julio Cezar Durigan, magnífico Reitor da UNESP, e pelo Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, ora empossado. São Paulo, 16 de janeiro de 2017.

[Handwritten signatures and initials]

9.º TABELIÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 124 - 1.º ao 6.º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3259-2611 - Fax: (11) 2174-6858
www.noscartorio.com.br

Reconheço as 3 firmas sem valor econômico por semelhança de JULIO CEZAR DURIGAN, SANDRO ROBERTO VALENTINI, MARIA DALVA SILVA PAGOTTO. do que dou fé.

Em tes. da verdade. GUSTAVO FONTANA ANDOLPHO -
São Paulo/Capital, 16 de janeiro de 2017. Valor recebido R\$ 17,10
"Válido somente contra a falsificação. Selos pagos por verba"



06 MAR 2017



do Rote: Rua Rui Barbosa: 1.213,18 m² de recampamento, no trecho entre as Ruas Luiz Gonzaga e Rio de Janeiro; Rua Luiz Gonzaga: 868,50 m² de recampamento, no trecho entre as Ruas Rui Barbosa e Bernardino Pinto.

PARÁGRAFO ÚNICO: Inalterado.
CLÁUSULA SEGUNDA: A Cláusula Terceira, que trata das Obrigações dos Partícipes, passa a ter a seguinte redação: Para a execução do presente Convênio o ESTADO e o MUNICÍPIO terão as seguintes obrigações:

I - COMPETE AO ESTADO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

II - COMPETE AO MUNICÍPIO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

PARÁGRAFO PRIMEIRO: A prestação de contas a que se refere a alínea "e" do inciso II desta cláusula será encaminhada pelo MUNICÍPIO ao ESTADO, no prazo máximo de 30 (trinta) dias contados do encerramento da obra detalhada no cronograma físico-financeiro às fls. 31 e 106, e será encaminhada aos autos do processo correspondente para exame por parte do órgão competente.

PARÁGRAFO SEGUNDO: Inalterado;

PARÁGRAFO TERCEIRO: Inalterado;

CLÁUSULA TERCEIRA: A Cláusula Quarta, que trata do Valor, passa a ter a seguinte redação: O valor do presente Convênio é de R\$ 179.408,35, dos quais R\$ 160.000,00, de responsabilidade do ESTADO e o restante de responsabilidade do MUNICÍPIO.

Ficam mantidas todas as disposições do Convênio firmado em 16-05-2014 e aditado em 29-08-2016, naquilo em que não colidirem com as ora estabelecidas.

ASSINATURA: 21-12-2016

Extrato de Termo de Aditamento

1º Termo de Aditamento

Processo: 158022/2016 (0780/2014)

CONVÊNIO: 496/2014

PARCEIR JURÍDICO: 708/2016

Objeto: Construção de Barracão Múltiplo Uso

PARTÍCIPES: CASA CIVIL/SECRETARIA DE RELAÇÃO-

MENTO COM MUNICÍPIO E O MUNICÍPIO DE PIRAJUÍ

CLÁUSULA PRIMEIRA: A Cláusula Primeira, que trata do Objeto, passa a ter a seguinte redação: O presente Convênio tem como objeto a transferência de recursos financeiros para a execução de execução de construção de um Barracão Múltiplo Uso com área de 145,80m², localizado na Avenida da Saudade s/nº, Centro, conforme projeto às fls. 132/9.

1. Limpeza manual do terreno: 470,00m². 2. Brica de concreto p/ fundação: 182,60m. 3. Laje pré-fabricada: 172,00m². 4. Alvenaria em bloco cerâmico: 398,49m². 5. Porta lisa com batente de madeira: 12 pc. 6. Vidro liso: 27,18m². 7. Chapeiro: 972,98m². 8. Revestimento em placa cerâmica: 106,31m². 9. Piso cerâmico esmaltado: 201,79m². 10. Piso regularização e compactação: 309,10m². 11. Estrutura metálica p/ cobertura: 190,00kg. 12. Telha de barro: 172,00m². 13. Calhas e rufos: 92,40m. 14. Bacia sifonada c/ acoplada: 05 pc. 15. Lavatório de louça 01 pc. 16. Luminária: 28 pc. 17. Entrada de gás GLP c/ dois botijões de 13kg: 01 un. 18. Extintor manual p/ químico de 04kg: 02 pc. 19. Pintura tinta látex amarelo: 400,44m². 20. Instalações hidráulicas tubo PVC: 88,00m; 21. Serviços complementares diversos: 44,30m².

PARÁGRAFO ÚNICO: Inalterado.

CLÁUSULA SEGUNDA: A Cláusula Terceira, que trata das Obrigações dos Partícipes, passa a ter a seguinte redação: Para a execução do presente Convênio o ESTADO e o MUNICÍPIO terão as seguintes obrigações:

I - COMPETE AO ESTADO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

i) Inalterada;

j) Inalterada;

k) Inalterada;

l) Inalterada;

m) Inalterada;

n) Inalterada;

o) Inalterada;

p) Inalterada;

q) Inalterada;

r) Inalterada;

s) Inalterada;

t) Inalterada;

u) Inalterada;

v) Inalterada;

w) Inalterada;

x) Inalterada;

y) Inalterada;

z) Inalterada;

aa) Inalterada;

ab) Inalterada;

ac) Inalterada;

ad) Inalterada;

ae) Inalterada;

af) Inalterada;

ag) Inalterada;

ah) Inalterada;

ai) Inalterada;

aj) Inalterada;

ak) Inalterada;

al) Inalterada;

am) Inalterada;

an) Inalterada;

ao) Inalterada;

ap) Inalterada;

aq) Inalterada;

ar) Inalterada;

as) Inalterada;

at) Inalterada;

au) Inalterada;

av) Inalterada;

aw) Inalterada;

ax) Inalterada;

ay) Inalterada;

az) Inalterada;

ba) Inalterada;

bb) Inalterada;

bc) Inalterada;

bd) Inalterada;

be) Inalterada;

bf) Inalterada;

bg) Inalterada;

bh) Inalterada;

bi) Inalterada;

bj) Inalterada;

bk) Inalterada;

bl) Inalterada;

bm) Inalterada;

bn) Inalterada;

bo) Inalterada;

bp) Inalterada;

bq) Inalterada;

br) Inalterada;

bs) Inalterada;

bt) Inalterada;

bu) Inalterada;

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

i) Inalterada;

j) Inalterada;

k) Inalterada;

l) Inalterada;

m) Inalterada;

n) Inalterada;

o) Inalterada;

p) Inalterada;

q) Inalterada;

r) Inalterada;

s) Inalterada;

t) Inalterada;

u) Inalterada;

v) Inalterada;

w) Inalterada;

x) Inalterada;

y) Inalterada;

z) Inalterada;

aa) Inalterada;

ab) Inalterada;

ac) Inalterada;

ad) Inalterada;

ae) Inalterada;

af) Inalterada;

ag) Inalterada;

ah) Inalterada;

ai) Inalterada;

aj) Inalterada;

ak) Inalterada;

al) Inalterada;

am) Inalterada;

an) Inalterada;

ao) Inalterada;

ap) Inalterada;

aq) Inalterada;

ar) Inalterada;

as) Inalterada;

at) Inalterada;

au) Inalterada;

av) Inalterada;

aw) Inalterada;

ax) Inalterada;

ay) Inalterada;

az) Inalterada;

ba) Inalterada;

bb) Inalterada;

bc) Inalterada;

bd) Inalterada;

be) Inalterada;

bf) Inalterada;

bg) Inalterada;

bh) Inalterada;

bi) Inalterada;

bj) Inalterada;

bk) Inalterada;

bl) Inalterada;

bm) Inalterada;

bn) Inalterada;

bo) Inalterada;

bp) Inalterada;

bq) Inalterada;

br) Inalterada;

bs) Inalterada;

bt) Inalterada;

bu) Inalterada;

bv) Inalterada;

bw) Inalterada;

bx) Inalterada;

by) Inalterada;

bz) Inalterada;

ca) Inalterada;

cb) Inalterada;

cc) Inalterada;

cd) Inalterada;

ce) Inalterada;

cf) Inalterada;

cg) Inalterada;

ch) Inalterada;

ci) Inalterada;

cj) Inalterada;

ck) Inalterada;

cl) Inalterada;

cm) Inalterada;

cn) Inalterada;

co) Inalterada;

cp) Inalterada;

cq) Inalterada;

cr) Inalterada;

cs) Inalterada;

ct) Inalterada;

cu) Inalterada;

cv) Inalterada;

cw) Inalterada;

cx) Inalterada;

cy) Inalterada;

cz) Inalterada;

da) Inalterada;

db) Inalterada;

dc) Inalterada;

dd) Inalterada;

de) Inalterada;

df) Inalterada;

dg) Inalterada;

dh) Inalterada;

di) Inalterada;

dj) Inalterada;

dk) Inalterada;

dl) Inalterada;

dm) Inalterada;

dn) Inalterada;

do) Inalterada;

dp) Inalterada;

dq) Inalterada;

dr) Inalterada;

ds) Inalterada;

dt) Inalterada;

du) Inalterada;

dv) Inalterada;

dw) Inalterada;

dx) Inalterada;

dy) Inalterada;

dz) Inalterada;

ea) Inalterada;

eb) Inalterada;

ec) Inalterada;

ed) Inalterada;

ee) Inalterada;

ef) Inalterada;

eg) Inalterada;

eh) Inalterada;

ei) Inalterada;

ej) Inalterada;

ek) Inalterada;

el) Inalterada;

em) Inalterada;

en) Inalterada;

eo) Inalterada;

ep) Inalterada;

eq) Inalterada;

er) Inalterada;

es) Inalterada;

et) Inalterada;

eu) Inalterada;

ev) Inalterada;

ew) Inalterada;

ex) Inalterada;

ey) Inalterada;

ez) Inalterada;

fa) Inalterada;

fb) Inalterada;

fc) Inalterada;

fd) Inalterada;

fe) Inalterada;

ff) Inalterada;

fg) Inalterada;

fh) Inalterada;

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

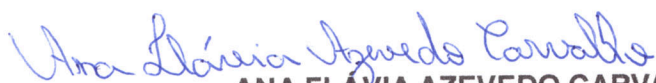
Cedentes: 1. **ANA FLÁVIA AZEVEDO CARVALHO**, brasileira, casada, bióloga, inscrita no CPF/MF sob o nº 012.381.896-60, portadora do documento de identidade RG nº 10755843, SSP/MG, residente em Assis (SP), na Av. Dom Antônio, nº 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900; 2. **DOUGLAS FERNANDES DA SILVA**, brasileiro, solteiro, estudante, inscrito no CPF/MF sob o nº 311.387.228-63, portador do documento de identidade RG nº 45.378.272-3, SSP/SP, residente em Rio Claro (SP), na Avenida 24 A, nº 1515, Santana, CEP 13506-900; 3. **LUDMILA MELO HERGESEL**, brasileira, solteira, estudante, inscrita no CPF/MF sob o nº 419.086.678-42, portadora do documento de identidade RG nº 41.267.849-4, SSP/SP, residente em Assis (SP), na Av. Dom Antônio, nº 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900; 4. **PEDRO DE OLIVA NETO**, brasileiro, casado, professor universitário, inscrito no CPF/MF sob o nº 045.828.128-05, portador do documento de identidade RG nº 14.547183-4, SSP/SP, residente em Assis (SP), na Av. Dom Antônio, nº 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900; 5. **TANIA SILA CAMPIONI**, brasileira, solteira, estudante, inscrita no CPF/MF sob o nº 356.338.498-33, portadora do documento de identidade RG nº 44.078.175-9, SSP/SP, residente em Assis (SP), na Av. Dom Antônio, nº 2100, Parque Universitário, CEP 19806-900. **Cessionária:** **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"** - UNESP, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010, neste ato representada nos termos da procuração outorgada.

Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a Cessionária a depositar o pedido de patente intitulado **"PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS"** junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14.05.1996 e Lei 8.666 de 21.06.1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

Assis, 10 de maio de 2018.

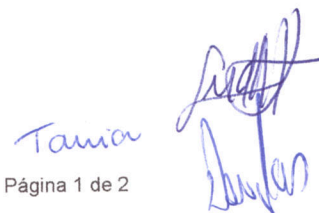
Cedentes:

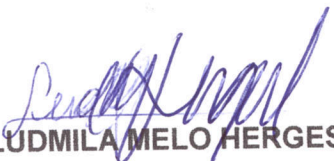


ANA FLÁVIA AZEVEDO CARVALHO



DOUGLAS FERNANDES DA SILVA

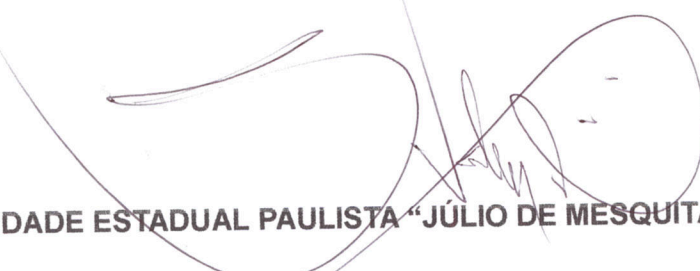



LUDMILA MELO HERGESEL


PEDRO DE OLIVA NETO


TANIA SILA CAMPIONI

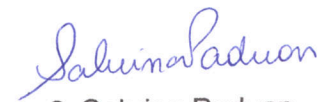
Cessionárias:

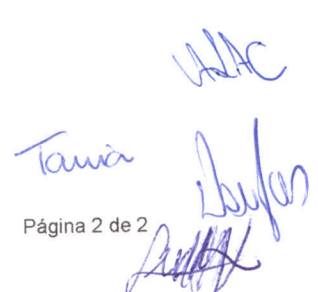

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP

SANDRO ROBERTO VALENTIM
REITOR

Testemunhas:


1. Keyla Santos Bento
CPF/MF: 323.669.268-55


2. Sabrina Paduan
CPF/MF: 389.723.218-93



DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"

Inventores: Ana Flávia Azevedo Carvalho; Douglas Fernandes Da Silva; Ludmila Melo Hergesel; Pedro De Oliva Neto; Tania Sila Campioni

Nós, inventores abaixo assinados, declaramos que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Assis, 10 de maio de 2018.


ANA FLÁVIA AZEVEDO CARVALHO


DOUGLAS FERNANDES DA SILVA


LUDMILA MELO HERGESEL


PEDRO DE OLIVA NETO


TANIA SILA CAMPIONI

“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção trata de processo para produção de enzimas xilanases via fermentação em estado líquido utilizando substratos lignocelulósicos, com ou sem a presença de amidos pré-tratados ou não, podendo ser complementado com sacarose e sais de baixo custo, via fermentação submersa com fungos lignocelulolíticos, atingindo valores de produção de xilanase fúngica superiores ao estado da técnica.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] Devido à crise energética e ambiental que o mundo está vivendo, causada pela dependência do petróleo e os problemas ambientais por ele gerados, há a necessidade de reavaliar a utilização eficiente das fontes naturais e renováveis, incluindo resíduos orgânicos (biomassa lignocelulósica), através de tecnologias limpas para produção de biocombustíveis, e demais produtos de valor agregado (HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. *Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology*, v. 2, n. 12, p. 602–619, 2003; BALAT, M. *Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. Energy Conversion and Management*, v. 52, n.2, p. 858–875, 2011). Com base na colheita de 2010, é verificado que o Brasil gera toneladas de resíduos lignocelulósicos por ano, dentre eles podendo ser citados (em mil ton/ano): cana-de-açúcar (166,7), milho (sabugo+palha) (15), arroz (18), trigo (8,6), café (2,6), feijão (1,6), madeira (50,7) e amendoim (78,4) (DIAS, J. M. C. DE S.; SOUZA, D. T.; ONOYAMA, M. M.; MIRANDA, C.H.B; BARBOSA, P.F.D.; ROCHA, J.D. EMBRAPA Documentos – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção de briquetes e peletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais. Documento 13, ISSN 2177-4439, 132 p., 2012).

[003] Assim, o país torna-se um alvo estratégico para a utilização dos mais diversos lignocelulósicos existentes para produção biotecnológica de uma gama de produtos, como enzimas (ALENCAR GUIMARAES, N. C.; SORGATTO, M., PEIXOTO-NOGUEIRA, S. D. C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; GIANNESI, G. C. *Bioprocess and*

biotechnology: effect of xylanase from Aspergillus niger and Aspergillus flavus on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. Springer Plus, v. 2, n. 380, p. 2-7, 2013; LUZ, J. M.R.; NUNES, M. D.; PAES, S. A., TORRES, D. P., SOARES, M. D. C., CATARINA, M. *Lignocellulolytic enzyme production of Pleurotus ostreatus growth in agroindustrial wastes. Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1508–1515, 2012; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A; DA SILVA, T. M.; JORGE, J. A; TERENCEZ, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Production and properties of xylanases from Aspergillus terricola Marchal and Aspergillus ochraceus and their use in cellulose pulp bleaching. Bioprocess and biosystems engineering*, v. 33, n. 7, p. 813–21, 2010; FREITAS, A. C. DE; ESCARAMBONI, B.; CARVALHO, A.F.A.; LIMA, V.M.G.; OLIVA-NETO, P. *Production and application of amylases of Rhizopus oryzae and Rhizopus microsporus var. oligosporus from industrial waste in acquisition of glucose. Chemical Papers*, v. 68, n. 4, p. 442-450, 2014.), alimentos funcionais (CARVALHO, A. F. A.; OLIVA NETO, P.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. *Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. Food Research International*, v. 51, n.1, p. 75–85, 2013.), biocombustíveis (VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; DE SOUZA JR., M. B.; PEREIRA Jr., N. *Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 07, p. 141–154, 2007.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; SANTOS, J. C.; ROSA, C. A.; SILVA, S. S. *Bioethanol Production from Sugarcane Bagasse by a Novel Brazilian Pentose Fermenting Yeast Scheffersomyces shehatae UFMG-HM 52. 2: Evaluation of Fermentation Medium. International Journal of Chemical Engineering*, p. 1–8, 2014.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. *Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. 3 Biotech*, v. 3, n. 5, p. 373–379, 2012.), papel e celulose dentre outras finalidades.

[004] As enzimas destacam-se no desenvolvimento tecnológico mundial, pois possuem características operacionais que garantem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. As suas aplicações podem ser encontradas em diversos setores.

Além disso, as enzimas são ferramentas chave para pesquisa e desenvolvimento de produtos e processos (LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. *Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering Abstract: Enzymes are protein molecules functioning as specialized catalysts for chemical reactions. They have contributed greatly to the traditional and modern chemical industr. Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012; DÍAZ-MALVÁEZ, F. I.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; HERNÁNDEZ-ARANA, A.; AMARO-REYES, A.; REGALADO-GONZÁLEZ, C. *Isolation and properties of β -xylosidase from *Aspergillus niger* GS1 using corn pericarp upon solid state fermentation. Process Biochemistry*, v. 48, n. 7, p. 1018–1024, 2013; MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A., TELLES RIBEIRO, H. C. *Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. Electronic Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 6, p. 1–13, 2010). Por serem biodegradáveis e possuírem alta especificidade, a hidrólise enzimática gera poucos subprodutos, reduz os passos dos processos de “downstream”, e o gasto energético. Além disso, representam a possibilidade de um processo ser realizado sob condições brandas de pH e temperatura. Como resultado, são atingidos altos rendimentos do processo (FERNANDES, P. *Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. Enzyme research*, p. 1–19, 2010; TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. Bioresources*, v. 2, n. 4, p. 707–738, 2007).

[005] A literatura técnica descreve estudos com o objetivo de aumentar a produção de enzimas hidrolíticas por fermentação de resíduos agrícolas através de processos biotecnológicos, resultando em rendimentos promissores, possibilitando assim o uso destes resíduos e diminuindo os custos de produção.

[006] Uma variedade de resíduos agrícolas, podem ser utilizados para produzir enzimas que degradam sua parede celular, como, por exemplo, celulasas e xilanasas, pois estes sistemas de produção simulam o ambiente natural de crescimento de fungos que degradam a madeira.

[007] Sabe-se que existem, aproximadamente, quatrocentas enzimas conhecidas, dentre elas duzentas são de origem microbiana e são usadas comercialmente.

Entretanto, apenas vinte são produzidas industrialmente em larga escala.

[008] Com o aprimoramento das pesquisas na compreensão da bioquímica da produção enzimática, processos de fermentação envolvidos, e novas metodologias de “downstream”, poderá haver um aumento considerável no número de enzimas disponíveis (LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. *Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering Abstract: Enzymes are protein molecules functioning as specialized catalysts for chemical reactions. They have contributed greatly to the traditional and modern chemical industr. Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012.).

[009] O mercado industrial de produção de enzimas lignocelulolíticas está concentrado no exterior, sendo as principais indústrias *Novozymes e Danisco/DuPont* (Dinamarca), Genecor (EUA), Basf (Alemanha) e Roche (Suíça) que lideram 75% da produção mundial de enzimas (LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. *Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering Abstract: Enzymes are protein molecules functioning as specialized catalysts for chemical reactions. They have contributed greatly to the traditional and modern chemical industr. Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012; JUTURU, V., Wu, J. C. *Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 33, p 188-203, 2014).

[010] No Brasil, a necessidade de exportação de enzimas aumenta os custos dos bioprocessos, de forma que novas tecnologias de produção interna são extremamente importantes para a viabilidade destes (LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. *Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering Abstract: Enzymes are protein molecules functioning as specialized catalysts for chemical reactions. They have contributed greatly to the traditional and modern chemical industr. Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012).

[011] As xilanases são um grupo de enzimas presentes nas mais diversas aplicações, destacando-se especialmente na indústria de polpa e papel, com expansão nas aplicações no setor de alimentos e em rações animais.

[012] As xilanases atuam principalmente na catálise da hidrólise das ligações

glicosídicas na cadeia da xilana em monômeros de açúcar, diminuindo o grau de polimerização do substrato (ALENCAR GUIMARAES, N. C.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. D. C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; GIANNESI, G. C. *Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from Aspergillus niger and Aspergillus flavus on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate*. Springer Plus, v.2, n.380, p.2-7, 2013; JUTURU, V.; WU, J. C. *Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications*. *Biotechnology Advances*, v.30, n. 6, p. 1219–27, 2012). Essas enzimas podem ser empregadas, igualmente, na clarificação de sucos, na extração de óleo vegetal e, ainda, podem melhorar a digestão de lignocelulósicos em animais (BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. *Microbial xylanases and their industrial applications: a review*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.56, p. 326–338, 2001.; SUBRAMANIAN, S.; PREMA, P. *Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application*. *Crit Rev Biotechnol*, v. 22, p. 33– 64, 2002.; TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. *Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocess: a review*. *Process Biochem*, v. 38, p. 1327–1340, 2003.; POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZ, H. F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D. S. *Xylanases from fungi: properties and industrial application*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 67, p. 577–591, 2005.; MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J.C. *Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals*. *Process Biochem*, v. 41, p. 1913-1923, 2006).

[013] Outra aplicação dessas enzimas é na produção e obtenção de xilo-oligossacarídeos (XOS) de resíduos agroindustriais (NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. *Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides*. *Carbohydr Polym*, v. 69, p. 20-28, 2007.; RODRIGUES, R. C. L. B.; ROCHA, G. J. M.; RODRIGUES, D.; IZÁRIO FILHO, H. J.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA, A. *Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH)*. *Biores. Technol*, v. 101, p. 1247–1253, 2010.).

[014] Os XOS são oligômeros obtidos da hidrólise (geralmente de materiais

lignocelulósicos) e são fibras dietéticas e baixo valor calórico e efeito pré-biótico (NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. *Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides*. *Carbohydr Polym*, v. 69, p. 20-28, 2007.).

[015] A produção de XOS de alta qualidade pode ser realizada através da hidrólise pelas xilanases, sendo sintetizadas por uma variedade de fungos: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaetes*, *Chytridiomycetes*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Clostridium* and *Bacillus* (BASTAWDE, K. B. *Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action*. *World J Microbiol Biotechnol*, v.8, p. 353–368, 1992.; CHRISTOV, L. P.; SZAKACS, G.; BALAKRISHNAN, H. *Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching*. *Process Biochem*, v.34, p. 511–517, 1999.; CARVALHO, A. F. A.; OLIVA NETO, P.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. *Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis*. *Food Research International*, v. 51, n.1, p. 75–85, 2013.).

[016] As xilanases são enzimas que degradam a xilana, a qual é o principal componente da hemicelulose. A endo β -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Trata-se de uma endo-enzima que hidrolisa aleatoriamente ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia de hemicelulose (na cadeia principal de xilana) liberando xilo-oligossacarídeos (HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANEIE, S. *Production of fungal xylanases*. *Biores. Technol.*, v. 58, p.137–161, 1996.; KULKARNI, N.; SHENDYE, A. R. *Molecular and biotechnological aspects of xylanases*. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 23, p. 411-456, 1999.). A degradação completa desta cadeia principal ocorre por uma ação sinérgica de endo e exo-xilanases (β - xilosidases ou β -D-xilosídeo xilohidrolases), que hidrolisam os xilo-oligômeros de baixa massa molecular resultantes.

[017] Apesar das xilanases fúngicas já serem produzidas industrialmente por alguns microrganismos, há grandes variações de preço, e o seu alto valor é um fator limitante para o seu uso industrial (100 g de endo β -1,4 xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* custa R\$ 620,00 - Sigma); 50 g de endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)-xilanase de *Thermomyces lanuginosus*

purificada e produzida por *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado custa R\$ 998,00 (Novozyme). Dados colhidos no site comercial da *Sigma Aldrich* de 12/03/2015.

[018] Para a aplicação na indústria de polpa e papel são interessantes xilanases termoestáveis e alcalofílicas e que sejam livres de celulase para não degradarem a celulose da polpa. A enzima xilanase produz modificações superficiais na fibra de celulose, proporcionando a melhor remoção de lignina residual presente na polpa. Essa ação xilanolítica proporciona a redução do consumo de reagentes de branqueamento.

[019] A conversão enzimática dos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis é uma etapa crítica na produção de etanol lignocelulósico. A hidrólise completa dos materiais lignocelulósicos necessita de diferentes enzimas, como as celulases, xilanases e beta glicosidases. As xilanases funcionam como enzimas acessórias na hidrólise da celulose, pois expõem as fibras de celulose cobertas por hemicelulose (REIS, L.; FONTANA, R. C.; DELABONA, P. D. S.; DA SILVA LIMA, D. J.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G. D. C.; DILLON, A. J. P. *Increased production of cellulases and xylanases by Penicillium echinulatum* S1M29 *in batch and fed-batch culture*. *Bioresource technology*, v. 146, p. 597–603, 2013.; CARVALHO, A.F.A.; OLIVA-NETO, P.; SILVA, D.F.; PASTORE, G.M. *Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis*. *Food Reser. Intern.* v.51, p.75-85, 2013). Xilose é o principal açúcar obtido após a hidrólise da hemicelulose presente nos materiais lignocelulolíticos, e também é uma fonte de carbono para vários processos fermentativos. A principal aplicação é a bioconversão de xilose a xilitol, um adoçante funcional com propriedades tecnológicas importantes, tais como anticariogênico, baixo valor calórico, e potencial utilização no tratamento de diabetes.

[020] Dessa forma, o interesse econômico na produção de xilitol pode ser melhorado se as soluções de xilose forem obtidas a partir de um processo de hidrólise de resíduos lignocelulósicos de baixo custo, incluindo enzimas e substratos (GÁMEZ, S.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. *Manufacture of Fermentable Sugar Solutions from Sugar Cane Bagasse Hydrolyzed with Phosphoric Acid at Atmospheric Pressure*. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, p. 4172–4177, 2004). Além disso, existe a produção de alimentos funcionais através da atuação das xilanases. Os XOSs são

oligossacarídeos incomuns, cujo componente principal são xiloses unidas por ligação β -1,4. Dentre as aplicações descritas destes XOS destacam-se a propriedade de fibras dietéticas solúveis que apresentam atividade prebiótica, favorecendo a melhora das funções intestinais e imunológico, atividade antimicrobiana e outros benefícios à saúde. Estes efeitos abrem uma nova perspectiva sobre o potencial para aplicação na produção animal e consumo humano. As matérias-primas que são ricas em hemicelulose podem sofrer tratamentos incluindo hidrólise enzimática, para liberação dos XOS (CARVALHO, A. F. A.; OLIVA NETO, P.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. *Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. Food Research International*, v. 51, n.1, p. 75–85, 2013).

[021] O aumento da demanda por celulasas é consequência de suas diversas aplicações, que incluem a indústria têxtil, de detergentes, papel e polpa, entre outras indústrias. Grandes empresas produtoras de celulase para conversão de biomassa, como ‘Genecor’ e ‘Novozymes’, não medem esforços para diminuir o preço de custo desta enzima através de pesquisas e novas tecnologias.

[022] A produção de enzimas lignocelulolíticas por cultivos microbianos é influenciada por vários parâmetros, incluindo a natureza do substrato celulósico, pH do meio, disponibilidade de nutrientes, suplementos indutores, temperatura de fermentação, entre outros, e a produção de celulasas em larga escala requer conhecimento e controle adequado do crescimento e capacidade de produção de enzimas do produtor. Estas enzimas produzidas por organismos decompositores, como os fungos filamentosos: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Humicola*, entre outros fungos, podem crescer em diversas faixas de pH e temperatura. A formulação do meio para fermentação é a maior preocupação, pois os meios comuns geram um crescimento com baixa produção de celulasas. Além da importância econômica que representam as enzimas xilanases e celulasas, o desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização eficiente de resíduos tem sido uma preocupação crescente a cada ano, uma vez que a maioria das agroindústrias geram, além do produto final, um grande volume de subprodutos.

[023] Para a melhor otimização na produção de xilanases, não somente o microrganismo é de extrema importância, mas também o meio de cultivo e todo os

bioprocessos envolvidos.

[024] A literatura técnica descreve diversos processos para a produção de xilanases, tais como:

[025] - BENOLIEL et al., 2013 (BENOLIEL B.; TORRES, F.A.G; MORAES, L.M.P. *A novel promising Trichoderma harzianum strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura*. Springer Plus. 2:656, 2013) usando linhagens T. harzianum L04 e FSm com bagaço de cana pré-tratado e, parcialmente deslignificado, como fonte de carbono reportaram apenas 6,51 U/mL de atividade xilanases.

[026] - TERRASAN et al., 2010 (TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. *Production of xylanolytic enzymes by Penicillium janczewskii*. Biores Technol, v. 101, p. 4139–4143, 2010) utilizaram o *Penicillium janczewskii* em fermentação submersa por 7 dias a 28 °C, e 9 diferentes resíduos agroindustriais, tendo o farelo de trigo com 15,4 U/mL, o farelo de aveia com 5,8 U/mL, espigas de milho com 5,3 U/mL, os grãos de cevada com 4,9 U/mL e o bagaço de cana com apenas 3,1 U/mL.

[027] - Gupta et al. (GUPTA, V.; GARG, S.; CAPALASH, N.; GUPTA, N.; SHARMA, P. *Production of thermo-alkali-stable laccase and xylanase by co-culturing of Bacillus sp. and B. halodurans for biobleaching of kraft pulp and deinking of waste paper*. Bioprocess Biosyst Eng., v. 38, n.5, p. 947-956, 2015) conseguiram uma produção de 1.685 U/g por grama de substrato, utilizando papel reciclado e com co-cultivação em Fermentação em Estado Sólido de Bacillus sp. e B. halodurans FNP135.

[028] - NCUBE et al. (NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; van RENSBURG, J.; NCUBE, J. *Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by Aspergillus niger FGSCA733 in solid-state fermentation*. Industrial Crops and Products, v. 37, p. 118-123, 2012.) conseguiram no máximo 6087 U/g de substrato de xilanases com *Aspergillus niger* FGSCA733 na fermentação em estado sólido com substrato de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) e suplementação com capim sapé (*Hyperthaenia sp.*).

[029] O estado da técnica descreve o uso de organismos modificados geneticamente e glicose como substrato para produção de enzimas xilanaes, o que encarece o processo, tornando-o pouco atrativo.

ANÁLISE DO ESTADO DA TÉCNICA

[030] Em pesquisa realizada em bancos de dados especializados foram encontrados documentos referentes à produção de enzimas xilanases, tal como, o documento de nº. BR11.2016.017349-0 que trata de xilanases GH10 ou um fragmento das mesmas, incluindo enzimas xilanases modificadas, todas tendo atividade de xilanase, em que a enzima ou fragmento da mesma fornece maior recuperação de óleo a partir de um material à base de grãos em comparação com uma enzima xilanase GH10 original ou de controle, a xilanase GH10 original tendo sido modificada em ao menos uma ou mais das seguintes posições 7, 25, 33, 64, 79, 89, 217 e 298, em que a numeração tem por base a numeração de aminoácidos da FveXyn4 (SEQ ID NO. 1). A invenção refere-se também a métodos de uso das xilanases GH10, por exemplo, para recuperação de óleo aprimorada.

[031] O documento de nº. PI 0111316-0 trata de enzimas de xilanase modificada que demonstram aumentada termoestabilidade e alcalofilicidade, quando comparada com suas contrapartes nativas. Várias xilanases modificadas demonstrando estas propriedades são descritas incluindo xilanases com pelo menos uma modificação na posição de aminoácido (10, 27, 29, 75, 104, 105, 125, 129, 132, 135, 144, 157, 161, 162, 165) ou uma combinação dos mesmos. Também é incluída na presente invenção uma xilanase modificada que compreende pelo menos um resíduo de aminoácido substituído e que pode ser caracterizado como tendo uma temperatura efetiva máxima (MET) entre cerca de 69°C a cerca de 78°C, em que a xilanase modificada é uma xilanase de Família 11 obtida de *Trichoderma* sp.. A presente invenção também inclui uma xilanase de Família 11 modificada obtida de uma *Trichoderma* sp., caracterizada como tendo um pH efetivo máximo (MEP) entre cerca de 5,8 a cerca de 7,6. As xilanases modificadas caracterizadas como tendo um MET entre cerca de 69°C a cerca de 78°C e um MEP entre cerca de 5,8 a cerca de 7,6 são também descritas.

[032] O documento de nº. PI 9206637-2 se refere a novas enzimas. Mais especificamente, a invenção fornece xilanases novas obteníveis a partir de cepas pertencendo ao gênero *Rhodothermus*. A invenção também se refere ao uso das xilanases no tratamento de polpa lignocelulósica.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[033] O avanço tecnológico da invenção é um processo para produção de xilanases, que utiliza meios de cultura tendo substratos de baixo custo e/ou resíduos agroindustriais pré-tratado biologicamente, assim como uma complementação alternativa de sacarose e sais de baixo custo, via fermentação submersa com fungos lignocelulolíticos, atingindo valores de produção de xilanase fúngica superiores à 6194,47 (Napier pré-tratado fisicamente) e 6599,23 (T1 – pré-tratamento biológico) U/g de substrato seco. A vantagem desta tecnologia é o baixo custo do substrato podendo ser empregado bagaço de cana, capins diversos e/ou palha de cana, assim como outros substratos de baixo custo.

[034] A invenção descreve um processo para produção de enzimas xilanases via fermentação em estado líquido utilizando substratos lignocelulósicos potencialmente útil para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como os Xilo-oligossacarídeos (XOS) que utilizam substratos ricos em hemicelulose hidrolisados por estas enzimas.

[035] A invenção descreve um processo para produção de enzimas xilanases via fermentação em estado líquido utilizando substratos lignocelulósicos, utilizando condições mínimas de sais e resíduos lignocelulósicos, por meio de um fungo eficiente, rústico e seguro para uso alimentar, apresentando rendimento de produção enzimática superior aos encontrados na literatura.

[036] A invenção descreve um processo para produção de enzimas xilanases via fermentação em estado líquido utilizando substratos lignocelulósicos que provê um extrato enzimático capaz de hidrolisar a hemicelulose.

[037] A invenção descreve um processo para produção de enzimas xilanases via fermentação em estado líquido potencialmente útil nas empresas de papel e celulose, produção de etanol de segunda geração, produção de pré-bióticos, nutrição animal, clarificação de sucos, extração de óleo vegetal, entre outros.

APLICAÇÃO

[038] O extrato xilanolítico desenvolvido pode ser usado em empresas de papel e celulose, produção de etanol de segunda geração, produção de pré-bióticos, nutrição animal. Além de poder ser empregada igualmente na clarificação de sucos, na extração de óleo vegetal e, ainda, podem melhorar a digestão da ração, capim ou resíduos

lignocelulósicos empregados na alimentação animal.

[039] Outra aplicação dessas enzimas é sua utilização na produção e obtenção de xilo-oligossacarídeos (XOS) a partir de resíduos agroindustriais de baixo custo tais como o bagaço ou palha da cana.

[040] A xilose obtida na hidrólise enzimática pode ainda ser utilizada na bioconversão de xilose a xilitol, um adoçante funcional com propriedades tecnológicas importantes, tais como anticariogênico, baixo valor calórico, e também pode ser usado para o tratamento de diabetes. Além da produção de alimentos funcionais com atividade prebiótica.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[041] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de desenhos, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou seu funcionamento:

A Figura 1 apresenta a produção de substrato T1 por fermentação em estado sólido (FES) em 20 a 30 após a inoculação do *P. 'ostreatus'* nas diferentes concentrações de sais e nutrientes (% m/m);

A Figura 2 apresenta o início da frutificação (a) e após 2 a 7 dias (b) com o fim da frutificação e colheita dos cogumelos, posteriormente o substrato foi seco em estufa e moído em moinhos de facas;

A Figura 3 apresenta o resultado de doze ensaios de Fermentação Submersa (FS) com diferentes tipos e concentrações de substratos (% - m/v), sendo o meio nutricional constituído de 11% de K₂HPO₄, 0,1% de (NH₄)₂SO₄, 0,0017% de MgSO₄.7H₂O, 0,0028% de ZnSO₄.7H₂O, 0,1% de extrato de levedura, 0,1% de NH₄H₂PO₄ e 0,06 % KCl. O Ensaio 1 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar in natura (BC); o Ensaio 2 foi composto meio nutricional + 3% (m/v) bagaço de cana-de-açúcar in natura (BC) + 1% (m/v) soro de leite (SL); o Ensaio 3 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) polpa cítrica (PCitr); o Ensaio 4 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) de polpa cítrica

(PCitr) + 1% (m/v) soro de leite (SL); o Ensaio 5 foi composto pelo meio nutricional + 1,5% (m/v) bagaço de cana-de-açúcar in natura (BC) + 1,5% (m/v) polpa cítrica (PCitr); o Ensaio 6 foi composto pelo meio nutricional + 1,5% (m/v) bagaço de cana-de-açúcar in natura (BC) + 1,5% (m/v) polpa cítrica (PCitr) + 1% (m/v) soro de leite (SL); o Ensaio 7 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) de Capim-Napier (*Pennisetum purpureum*) in natura; o Ensaio 8 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) de Capim-Napier (*Pennisetum purpureum*) in natura + 1% (m/v) sacarose (SC); o Ensaio 9 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) Capim-Napier (*Pennisetum purpureum*) tratado; o Ensaio 10 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) de Capim-Napier (*Pennisetum purpureum* tratado + 1% (m/v) sacarose (SC); o Ensaio 11 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) T1; o Ensaio 12 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) T1 + 1% (m/v) sacarose (SC), sendo os Ensaios 1 a 6 com 7 dias de fermentação; os ensaios 7 a 10 com 15 dias de fermentação e os Ensaios 11 e 12 com 10 dias de fermentação;

A Figura 4 apresenta a representação gráfica dos resultados dos doze ensaios de Fermentação Submersa (FS) nos diferentes tempos de cinética de produção enzimática, de 3 a 15 dias;

A Figura 5 apresenta a representação gráfica das superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática (U/g de substrato) em função de X1 e X2, sendo X1 a temperatura (em °C) e X2 o Ph;

A Figura 6 apresenta a representação gráfica da produção de XOS utilizando uma solução contendo extrato enzimático produzido com 60, 120 e 500 U/g de substrato em 50°C, com a eficiência da conversão de hemicelulose em XOS, expresso em porcentagem; e

A Figura 7 mostra a influência da temperatura na hidrólise enzimática usando diferentes concentrações de enzima xilanase e substrato hemicelulose para produção de XOS em 48 h de reação.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[042] Com referência aos desenhos ilustrados, a presente patente de invenção se refere à “PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM

ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”, mais precisamente trata de processo para produção de enzimas xilanases, a fim de, atingir valores de produção de xilanase fúngica superiores ao estado da técnica.

[043] Segundo a presente invenção o processo para produção de enzimas xilanases via fermentação em estado líquido utilizando substratos lignocelulósicos, compreende as etapas de:

- a) Pré-tratamento físico-químico do material lignocelulósico, em pelo menos uma etapa, à temperatura entre 50 °C a 180 °C;
- b) Substrato formado é adicionado entre 5,0 a 20,0% de biomassa de fungos basidiomicetos, cultivado em ambiente climatizado axênico por 10 a 60 dias, com temperatura entre 15 a 30 °C e umidade entre 50 a 90%;
- c) Cogumelo obtido é colhido;
- d) Trituração do resíduo final resultante do cultivo do cogumelo, entre 100-200 mesh, para obtenção do meio de cultura T1;
- e) Inoculação utilizando fungos lignocelulolíticos;
- f) Reação enzimática com hemicelulose e xilanases para obtenção de xilooligossacarídeos (XOS), sendo as enzimas produzidas adicionadas a um substrato selecionado dentre xilana comercial ou obtida da extração de lignocelulósicos;
- g) Hemicelulose extraída é hidrolisada pelas xilanases a 50°C, sendo as alíquotas colocadas em banho de ebulição para interromper a reação enzimática, e finalmente resfriada a temperatura ambiente e depois filtradas em membranas;
- h) Fermentação submersa para a produção das enzimas xilanolíticas realizada a temperatura entre 15 °C e 45 °C, por um período de 168 a 360 horas, no pH de 3,5 a 5,5, mediante agitação entre 100 a 250 rpm;
- i) extração enzimática em etapa única.

[044] A primeira etapa de preparo do meio nutricional, inclui materiais lignocelulósicos, com ou sem a presença de amidos, tal como Capim-Napier, *Pennisetum purpureum*, palha de cana de açúcar e bagaço de cana de açúcar, isolados ou em associação. Dita primeira etapa os materiais lignocelulósicos são submetidos a um pré-tratamento físico-químico, em pelo menos uma etapa, à temperatura entre 50°C a

180°C.

[045] Opcionalmente, os materiais lignocelulósicos podem ser submetidos a um pré-tratamento biológico com os fungos *basidiomicetos*, preferencialmente, mas não limitado ao *Pleurotus ostreatus*. Nesta etapa de pré-tratamento biológico, os resíduos lignocelulósicos são preparados por um período de 20 a 40 dias em cultivo axênico, contendo de 30,0 a 70,0% de bagaço de cana-de-açúcar; 10,0 a 60,0% de farelo de soja; 1,0 a 20,0% de farelo de algodão; 1,0 a 10,0% de CaCO₃, e 1 a 3 partes de água para cada parte de substrato na base seca (ml/g).

[046] Ao substrato formado é adicionada entre 5,0 a 20,0% de biomassa de fungos basidiomicetos, sendo cultivado em ambiente climatizado axênico por 10 a 60 dias, com temperatura entre 15 a 30°C e umidade entre 50 a 90%.

[047] O cogumelo obtido é colhido, e o resíduo final resultante deste cultivo é triturado (100-200 mesh), sendo obtido o meio de cultura aqui denominado T1, para fins de simplificação.

[048] Os materiais lignocelulósicos, pré-tratados ou não, podem ser acrescidos de até 10% m/v de sacarose; de até 2% m/v de K₂HPO₄; de até 2% m/v de (NH₄)₂SO₄; de até 1% m/v de MgSO₄.7H₂O; de até 1% m/v de ZnSO₄.7H₂O; de 0,0028%,0 a 1% m/v de extrato de levedura; e de 0,1%, 0 a 1% m/v de NH₄H₂PO₄.

[049] A etapa de inoculação pode ser feita por esporos ou por micélio (células filamentosas), sendo utilizados fungos das espécies *Trichoderma* spp. (tal como *Trichoderma reesei* QM9414, *Trichoderma reesei* CCT2768, *Trichoderma harzianum*) *Aspergillus* spp. (tal como *Aspergillus fumigatus*) ou outros gêneros lignocelulolíticos.

[050] Na inoculação utilizando esporos, são utilizados entre 10³ a 10⁸ esporos por ml de meio de cultivo.

[051] A inoculação utilizando micélio é feita a partir da retirada de 1 a 3 círculos de 3 a 20 mm de diâmetro da placa do meio BDA, ou utilizando um pré-cultivo líquido com o meio nutricional T1 na proporção de 10% da cultura líquida em relação ao volume do meio preparado para a produção do extrato enzimático xilanolítico e celulolítico.

[052] Na reação enzimática com hemicelulose e xilanases para obtenção de xilooligossacarídeos (XOS), as enzimas produzidas através do método descrito na

presente invenção são adicionadas a um substrato selecionado dentre xilana comercial ou obtida da extração de lignocelulósicos, tais como o bagaço de cana-de-açúcar. A hemicelulose extraída é hidrolisada pelas xilanases a 50°C, sendo as alíquotas colocadas em banho de ebulição para interromper a reação enzimática, e finalmente resfriada a temperatura ambiente e depois filtradas em membranas.

[053] A análise dos açúcares liberados na hidrólise enzimática pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

[054] A quantificação de oligômeros maiores que xilohexaose são realizadas pela diferença entre XOS totais (XT) obtidos a partir da hidrólise ácida e XOS com 2-6 unidades de xilose.

[055] Rendimento de xilooligossacarídeos pode ser obtidos através do cálculo: rendimento da produção de XOS (EXOS) = massa de XOS/massa bagaço seco x 100 (%).

[056] Utilizando-se uma faixa de 60 a 350 U xilanase/g de substrato a temperatura de reação de 50°C e 2 a 7% de xilana como substrato, pode-se obter rendimento total de XOS superior a 35%.

[057] A Fermentação Submersa para a produção das enzimas xilanolíticas é realizada a temperatura entre 15°C e 45°C, por um período de 168 a 360 horas, no pH de 3,5 a 5,5, mediante agitação entre 100 a 250 rpm.

[058] Na etapa de extração enzimática em etapa única, a parte sólida é separada da parte líquida por pressão, sendo obtido o extrato enzimático, ou mediante centrifugação em 1500 a 5000 rpm, por 5 a 30 minutos.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE XILANASE

[059] Para a reação de hidrólise enzimática deverão ser utilizadas de 0,1 a 1,0 % de xilana em 0,5 ml de substrato, preferencialmente 0,5%; com adição de 1 ml de tampão e o extrato enzimático produzido, em temperatura entre 20°C a 65°C, preferencialmente entre 50°C e 60°C e pH de 3 a 7, preferencialmente pH de 4,5 a 6,0; entre 1 a 20 horas, preferencialmente 1 a 12 horas de hidrólise. Nesta etapa, os substratos devem estar gelatinizados em solução tampão de acordo com o pH definido, ou simplesmente em água ou outro veículo.

[060] Produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) com a utilização da xilanases produzida,

comparada com a enzima comercial (conhecida por Novozyme® xylanase (NS22083)). A reação enzimática deverá ser conduzida com volume de 5 a 20 ml de extrato enzimático, preferencialmente 10 ml, contendo 30 a 1000 U de atividade xilanolítica por grama de substrato com grande concentração de hemicelulose. A mistura deverá ser incubada de 30 a 70 °C, preferencialmente 50 °C, por 3 a 120 horas, preferencialmente 72 horas; em agitação de 80 a 180 rpm, preferencialmente 130 rpm. A reação enzimática será interrompida em banho em ebulição por 10 minutos.

REAÇÃO ENZIMÁTICA COM HEMICELULOSE E XILANASES PARA OBTENÇÃO DE XOS

[061] Para obtenção de xilooligossacarídeos (XOS) devem ser utilizadas as enzimas produzidas pela técnica descrita e como substrato pode ser usada a xilana comercial ou obtida da extração de lignocelulósicos tais como o bagaço de cana, sabugo de milho ou outros compostos que contém especialmente a hemicelulose. A reação de hidrólise da hemicelulose extraída é realizada com a mistura do substrato e enzimas xilanases em erlenmeyer (125 ml) ou reatores, podendo-se utilizar, para demonstração, um volume de 40 ml de tampão acetato (0,5 M, pH 5,0) ou outros tampões e pHs, ou mesmo água. A mistura é incubada a 130 rpm. As hidrólises podem ser realizadas utilizando hemicelulose (2%) e 60, 120 ou 500 U/g de xilanase, a 50°C. Alíquotas devem ser retiradas com 6, 24, 48, 72, e 96 h de hidrólise para acompanhamento da produção de XOS. As alíquotas devem ser colocadas em banho de ebulição por 10 min para interromper a reação enzimática, e finalmente resfriada a temperatura ambiente, e depois filtradas em membranas millipore de 0,22 µm para análise.

[062] A análise dos açúcares liberados na hidrólise enzimática pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para identificação e quantificação dos xilo-oligossacarídeos é utilizada a coluna Carbopac PA-100 a 30 °C. A eluição dos XOS é realizada com gradiente linear de acetato de sódio 500 mM com hidróxido de sódio 200 mM (0 a 13%) durante 10 min, seguido de uma etapa de lavagem com acetato de sódio 500 mM por 5 min e por último é realizada uma etapa de estabilização com hidróxido de sódio 200 mM por 7 min, a um fluxo de 1 ml/min. O tempo final das análises são de 21 minutos. Curvas de calibrações são realizadas com os padrões xilose, xilobiose,

xilotriose, xiloheptaose, xilopentaose e xilohexaose.

[063] A quantificação de oligômeros maiores que xilohexaose são realizadas pela diferença entre XOS totais (XT) obtidos a partir da hidrólise ácida e XOS com 2-6 unidades de xilose. Rendimento de xilooligossacarídeos pode ser obtidos através do cálculo: rendimento da produção de XOS (EXOS) = massa de XOS/massa bagaço seco x 100 (%).

ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FS):

[064] Os ensaios de fermentação submersa foram realizados com diferentes concentrações de substratos lignocelulósicos, tendo como base o meio nutricional (11% de K_2HPO_4 , 0,1% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,0017% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0028% de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% de extrato de levedura, 0,1% de MAP ($NH_4H_2PO_4$) e 0,06 % KCl).

- O Ensaio 1 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BC);
- O Ensaio 2 foi composto meio nutricional + 3% (m/v) bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BC) + 1% (m/v) soro de leite (SL);
- O Ensaio 3 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) polpa cítrica (PCitr);
- O Ensaio 4 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) polpa cítrica (PCitr) + 1% (m/v) soro de leite (SL);
- O Ensaio 5 foi composto pelo meio nutricional + 1,5% (m/v) bagaço de cana-de-açúcar '*in natura*' (BC) + 1,5% (m/v) polpa cítrica (PCitr);
- O Ensaio 6 foi composto pelo meio nutricional + 1,5% (m/v) bagaço de cana-de-açúcar '*in natura*' (BC) + 1,5% (m/v) polpa cítrica (PCitr) + 1% (m/v) soro de leite (SL);
- O Ensaio 7 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) Napier '*in natura*';
- O Ensaio 8 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) Napier '*in natura*' + 1% (m/v) sacarose (SC);
- O Ensaio 9 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) Napier tratado;
- O Ensaio 10 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) Napier tratado + 1% (m/v) sacarose (SC);
- O Ensaio 11 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) T1;
- O Ensaio 12 foi composto pelo meio nutricional + 3% (m/v) T1 + 1% (m/v) sacarose (SC).

[065] O substrato T1 foi composto por 50% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar in natura, 40% (m/m) de farelo de trigo, 10% (m/m) de farelo de trigo, adicionado 6% (m/m) CaCO_3 sobre o peso final e adicionado para cada 100g do substrato seco 100 a 150ml de água. Esse substrato foi mantido por em fermentação e estado sólido (FES) por 20 a 40 dias com o *Pleurotus ostreatus*, preferencialmente 30 dias, em temperatura de 15 a 30 °C, preferencialmente 20 °C, até o total crescimento do fungo (figura 1). O substrato T1 se caracterizou como um efetivo pré-tratamento após o total crescimento do *Pleurotus ostreatus* como evidente na figura 1. A frutificação foi induzida em temperatura de 10 a 16 °C, do T1 em um período de 2 a 7 dias para posterior colheita dos cogumelos, como evidenciado na figura 2, somente após essa etapa o substrato residual foi seco em estufa de 100 a 105 °C e triturado em moinho de facas e peneirado (100 -200 mesh) e, assim, obtido o chamado substrato T1.

[066] Conforme evidenciado na figura 3, a maior produção de xilanase foi de $6599,23 \pm 119,84$ U/g de substrato (ensaio 12) para o substrato T1 (3% m/v) e suplementação inicial de carboidratos de sacarose (1% m/v) e de $6194,47 \pm 58,38$ U/g de substrato (ensaio 10) para o Napier tratado + 1% sacarose (SC). Isto representa um aumento de 1042% para o T1 + SC e de 977,73% Napier tratado + SC na atividade enzimática quando comparado com o bagaço de cana-de-açúcar ($633,56 \pm 61,70$ U/g de substrato - ensaio 1), ou de 926,36% para o T1 + SC e de 869,54% para o Napier tratado + SC quando comparado com os testes que utilizaram bagaço de cana (BC) + soro de leite (SL) ($712,39 \pm 31,02$ U/g de substrato - ensaio 2).

[067] Os resultados mostraram que a substituição dos substratos, principalmente com as etapas de pré-tratamento e suplementação com sacarose, assim como o aumento nos dias de fermentação, elevou em aproximadamente 10 vezes a produção enzimática, evidenciando que, ao utilizar esses substratos para a produção das xilanases, principalmente com os tratamentos e a suplementação, foi facilitada a ação do fungo na síntese enzimática.

[068] Conforme evidenciado na figura 4, para os ensaios 1, 2, 3, 4 e 5, o melhor dia para a produção das enzimas foi no 7º dia de fermentação; já para os ensaios 6, 7, 8 e 9, o melhor dia para a produção das enzimas foi no 15º dia de fermentação, enquanto para

os Ensaios 10 e 11, o 10º dia foi o melhor na produção das xilanases.

[069] Como os ensaios 1 e 2, 3, 4, 5 e 6 foram estatisticamente iguais quanto à atividade xilanólítica ($p > 0,05$), e todos com 7 dias de fermentação, os ensaios 7 e 9 foram estatisticamente iguais. Contudo o melhor resultado deu-se com o Napier tratado e com suplementação de sacarose (ensaio 10), sendo estatisticamente diferentes dos demais ($p < 0,05$), e o melhor resultado T1 com adição de sacarose (ensaio 12) foi o superior a todos os demais e com valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

[070] Para o melhor substrato (T1 + sacarose (ensaio 12)) e no tempo de 10 dias de fermentação, foi realizado um planejamento experimental para as condições de Fermentação Submersa. Foi empregado um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) com quatro ensaios nos pontos axiais e triplicata no ponto central - DCCR de 2, apresentado na Tabela 1, com as especificações dos níveis das variáveis apresentados na Tabela 2.

- Tabela 1: Delineamento experimental para o processo de obtenção de amilase, as respostas obtidas e os valores previstos pelo modelo estatístico.

Ensaios	Variáveis codificadas		Atividade (U/g de substrato)	
	Temperatura	pH	Experimental	Previsto
1	-1	-1	5055,39	5448,2
2	-1	1	5178,80	5283,1
3	1	-1	5632,79	5337,1
4	1	1	5139,21	5471,9
5	-1.41	0	5610,82	5350,4
6	1.41	0	5768,48	5620,2
7	0	-1.41	5686,13	5495,7
8	0	1.41	5478,13	5259,8
9	0	0	6856,62	6859,3
10	0	0	6837,42	6859,3
11	0	0	6900,56	6859,3

- Tabela 2: Especificação dos níveis das variáveis utilizadas no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).

Níveis codificados	Valores reais das variáveis em estudo	
	Temperatura °C (X_1)	pH (X_2)
-1,41	25,0	3,5
-1,00	26,5	3,8
0,00	30,0	4,5
1,00	33,5	5,2
1,41	35,0	5,5

[071] Conforme apresentado na tabela 1, xilanases sintetizadas por *T. reesei* QM9414 variaram de 5055,39 (ensaio 1) a 6900,56 U/g de substrato (ensaio 11). Para o valor mais baixo de atividade enzimática obtida, as condições físico-químicas testadas nas fermentações foram as mais baixas (temperatura de 26,5 °C e pH de 3,8), e os valores mais altos foram obtidos perto do valor já testado anteriormente (30 °C e pH 4,5).

- Tabela 3: Coeficientes de regressão para o modelo polinomial utilizando variáveis codificadas.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (5)	p - valor
Média	-81384,5	12744,42	-6,38589	0,001394
X_1 (L)	3607,9	596,40	6,04958	0,001779
X_1 (Q)	-55,0	9,05	-6,07351	0,001748
X_2 (L)	15104,6	2614,89	5,77638	0,002187
X_2 (Q)	-1481,5	226,23	-6,54875	0,001244
$X_1 X_2$	-63,0	54,51	-1,15503	0,300275

Regr. 'Coefficients'; Var.:U/g de substrato; R-sqr=,92796; Adj:,85593 (xilanase), 2 'factors', 1 'Blocks', 11 Runs; MS Residual=7335,98, DV: U/g de substrato.

[072] Com a análise dos coeficientes de regressão, apresentados na Tabela 3, é possível observar que os termos relacionados às duas variáveis (X_1 e X_2), afetam a síntese de xilanases. Contudo, a interação entre as variáveis X_1 e X_2 não apresentou efeitos estatisticamente significativos. O modelo com as variáveis codificadas incluindo os parâmetros significativos $p < 0,10$ é expresso por: Atividade (U/g de substrato) = $-81384,5 + 3607,9X_1 - 55,0X_{12} + 15104,6X_2 - 1481,5X_{22}$ ($r=0,927$).

[073] Através da análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, apresentadas na figura 7, verifica-se que, para a obtenção da máxima produção enzimática, deve-se trabalhar com uma faixa de temperatura de 28 a 32 °C e pH de 4,4 a 4,6 (condições do ponto central).

[074] No processo de produção de XOS foi verificado que o perfil de hidrólise enzimática do substrato com a enzima xilanolítica produzida foi superior à enzima comercial *Novozyme* NS 22083, chegando a um valor de 1,04 mg/ml de produção de XOS para apenas 0,50 mg/mL com a enzima comercial. A produção do XOS com enzima produzida pela Fermentação Submersa nos protocolos anteriormente descritos utilizou de 30 – 1000U/g de substrato, preferencialmente 500U/g de substrato, obtendo 35-38% de rendimento de produção de XOS, em 48-72 horas e uma concentração de 2% de hemicelulose. E, utilizando-se uma faixa de 60 a 350 U xilanase/g de substrato a temperatura de reação de 50 °C, e 2 a 7% de xilana como substrato, pode-se obter rendimento total de XOS superior a 35%.

[075] É certo que quando o presente invento for colocado em pratica, poderão ser introduzidas modificações, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

REFERÊNCIAS

ALENCAR GUIMARAES, N. C.; SORGATTO, M., PEIXOTO-NOGUEIRA, S. D. C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; GIANNESI, G. C. *Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from Aspergillus niger and Aspergillus flavus on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. Springer Plus*, v. 2, n. 380,

p. 2-7, 2013.

ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; SANTOS, J. C.; ROSA, C. A.; SILVA, S. S. *Bioethanol Production from Sugarcane Bagasse by a Novel Brazilian Pentose Fermenting Yeast Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52 . 2: *Evaluation of Fermentation Medium. International Journal of Chemical Engineering*, p. 1–8, 2014.

BALAT, M. *Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. Energy Conversion and Management*, v. 52, n.2, p. 858–875, 2011.

BASTAWDE, K. B. *Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World J Microbiol Biotechnol*, v.8, p. 353–368, 1992.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. *Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol*, v.56, p. 326–338, 2001.

CARVALHO, A. F. A.; OLIVA NETO, P.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. *Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. Food Research International*, v. 51, n.1, p. 75–85, 2013.

CHRISTOV, L. P.; SZAKACS, G.; BALAKRISHNAN, H. *Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. Process Biochem*, v.34, p. 511–517, 1999.

DIAS, J. M. C. DE S.; SOUZA, D. T.; ONOYAMA, M. M.; MIRANDA, C.H.B; BARBOSA, P.F.D.; ROCHA, J.D. EMBRAPA Documentos – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Produção de briquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais. Documento 13, ISSN 2177-4439, 132 p., 2012.*

DÍAZ-MALVÁEZ, F. I.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; HERNÁNDEZ-ARANA, A.; AMARO-REYES, A.; REGALADO-GONZÁLEZ, C. *Isolation and properties of β -xylosidase from Aspergillus niger GS1 using corn pericarp upon solid state fermentation. Process Biochemistry*, v. 48, n. 7, p. 1018–1024, 2013.

FERNANDES, P. *Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. Enzyme research*, p. 1–19, 2010.

FREITAS, A. C. DE; ESCARAMBONI, B.; CARVALHO, A.F.A.; LIMA, V.M.G.; OLIVA-NETO, P. *Production and application of amylases of Rhizopus oryzae and Rhizopus microsporus*

var. oligosporus from industrial waste in acquisition of glucose. Chemical Papers, v. 68, n. 4, p. 442-450, 2014.

GÁMEZ, S.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. *Manufacture of Fermentable Sugar Solutions from Sugar Cane Bagasse Hydrolyzed with Phosphoric Acid at Atmospheric Pressure. Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, p. 4172–4177, 2004.

GUPTA, V.; GARG, S.; CAPALASH, N.; GUPTA, N.; SHARMA, P. *Production of thermo-alkali-stable laccase and xylanase by co-culturing of Bacillus sp. and B. halodurans for biobleaching of kraft pulp and deinking of waste paper. Bioprocess Biosyst Eng.*, v. 38, n.5, p. 947-956, 2015.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANEIE, S. *Production of fungal xylanases. Biores. Technol.*, v. 58, p.137–161, 1996.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. *Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology*, v. 2, n. 12, p. 602–619, 2003.

JUTURU, V., WU, J. C. *Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 33, p 188-203, 2014.

JUTURU, V.; WU, J. C. *Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. Biotechnology Advances*, v. 30, n. 6, p. 1219–27, 2012.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A. R. *Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol. Rev.* v. 23, p. 411-456, 1999.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. *Technology Prospecting on Enzymes : Application, Marketing and Engineering Abstract: Enzymes are protein molecules functioning as specialized catalysts for chemical reactions. They have contributed greatly to the traditional and modern chemical industr. Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012.

LUZ, J. M.R.; NUNES, M. D.; PAES, S. A., TORRES, D. P., SOARES, M. D. C., CATARINA, M. *Lignocellulolytic enzyme production of Pleurotus ostreatus growth in agroindustrial wastes. Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1508–1515, 2012.

MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A., TELLES RIBEIRO, H. C. *Industrial and*

biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. Electronic Journal of Biotechnology, v. 13, n. 6, p. 1–13, 2010.

MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; DA SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; TERENCEZ, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Production and properties of xylanases from Aspergillus terricola Marchal and Aspergillus ochraceus and their use in cellulose pulp bleaching. Bioprocess and biosystems engineering*, v. 33, n. 7, p. 813–21, 2010.

MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. *Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. 3 Biotech*, v. 3, n. 5, p. 373–379, 2012.

MOURE, A.; GULLÓN, P.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J.C. *Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. Process Biochem*, v. 41, p. 1913-1923, 2006.

NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. *Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. Carbohydr Polym*, v. 69, p. 20-28, 2007.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; van RENSBURG, J.; NCUBE, J. *Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by Aspergillus niger FGSCA733 in solid-state fermentation. Industrial Crops and Products*, v. 37, p. 118-123, 2012.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZ, H. F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D. S. *Xylanases from fungi: properties and industrial application. Appl Microbiol Biotechnol*, v. 67, p. 577–591, 2005.

REIS, L.; FONTANA, R. C.; DELABONA, P. D. S.; DA SILVA LIMA, D. J.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G. D. C.; DILLON, A. J. P. *Increased production of cellulases and xylanases by Penicillium echinulatum S1M29 in batch and fed-batch culture. Bioresource technology*, v. 146, p. 597–603, 2013.

RODRIGUES, R. C. L. B.; ROCHA, G. J. M.; RODRIGUES, D.; IZÁRIO FILHO, H. J.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA, A. *Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). Biores. Technol*, v. 101, p. 1247–1253, 2010.

SUBRAMANIAN, S.; PREMA, P. *Biotechnology of microbial xylanases: enzymology,*

molecular biology, and application. Crit Rev Biotechnol, v. 22, p. 33– 64, 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. Bioresources*, v. 2, n. 4, p. 707–738, 2007.

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. *Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. Biores Technol*, v. 101, p. 4139–4143, 2010.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. *Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocess: a review. Process Biochem*, v. 38, p. 1327–1340, 2003.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; DE SOUZA JR., M. B.; PEREIRA Jr., N. *Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 07, p. 141–154, 2007.

REIVINDICAÇÕES

1) **“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”**, mais precisamente trata de processo para produção de enzimas xilanases, a fim de, atingir valores de produção de xilanase fúngica superiores ao estado da técnica; caracterizado por compreender as etapas de:

- a) pré-tratamento físico-químico do material lignocelulósico, em pelo menos uma etapa, à temperatura entre 50 °C a 180 °C;
- b) substrato formado é adicionado entre 5,0 a 20,0% de biomassa de fungos basidiomicetos, cultivado em ambiente climatizado axênico por 10 a 60 dias, com temperatura entre 15 a 30°C e umidade entre 50 a 90%;
- c) cogumelo obtido é colhido;
- d) trituração do resíduo final resultante do cultivo do cogumelo, entre 100-200 mesh, para obtenção do meio de cultura T1;
- e) inoculação utilizando fungos lignocelulolíticos;
- f) reação enzimática com hemicelulose e xilanases para obtenção de xilooligossacarídeos (XOS), sendo as enzimas produzidas adicionadas a um substrato selecionado dentre xilana comercial ou obtida da extração de lignocelulósicos;
- g) hemicelulose extraída é hidrolisada pelas xilanases a 50 °C, sendo as alíquotas colocadas em banho de ebulição para interromper a reação enzimática, e finalmente resfriada a temperatura ambiente e depois filtradas em membranas;
- h) fermentação submersa para a produção das enzimas xilanólíticas realizada a temperatura entre 15 °C e 45 °C, por um período de 168 a 360 horas, no pH de 3,5 a 5,5, mediante agitação entre 100 a 250 rpm;
- i) extração enzimática em etapa única.

2) **“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por etapa de pré-tratamento físico químico do material lignocelulósico ter a presença de amidos.

3) **“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM**

ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por material lignocelulósico ser acrescido de até 10% m/v de sacarose; de até 2% m/v de K_2HPO_4 ; de até 2% m/v de $(NH_4)_2SO_4$; de até 1% m/v de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; de até 1% m/v de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; de 0,0028%,0 a 1% m/v de extrato de levedura; e de 0,1%, 0 a 1% m/v de $NH_4H_2PO_4$.

4) **“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”,** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por fungos lignocelulolíticos serem selecionados dentre as espécies *Trichoderma spp.* e *Aspergillus spp.*

5) **“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”,** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por inoculação dos fungos lignocelulolíticos contemplar entre 103 a 108 de esporos por ml de meio de cultivo.

6) **“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”,** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por inoculação dos fungos lignocelulolíticos contemplar micélio.

7) **“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”,** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por material lignocelulósico ser submetido a um pré-tratamento biológico com fungos basidiomicetos, por um período de 20 a 40 dias em cultivo axênico, contendo de 30,0 a 70,0% de bagaço de cana-de-açúcar; 10,0 a 60,0% de farelo de soja; 1,0 a 20,0% de farelo de algodão; 1,0 a 10,0% de $CaCO_3$, e 1 a 3 partes de água para cada parte de substrato na base seca.

FIG. 1



FIG. 2

a



b



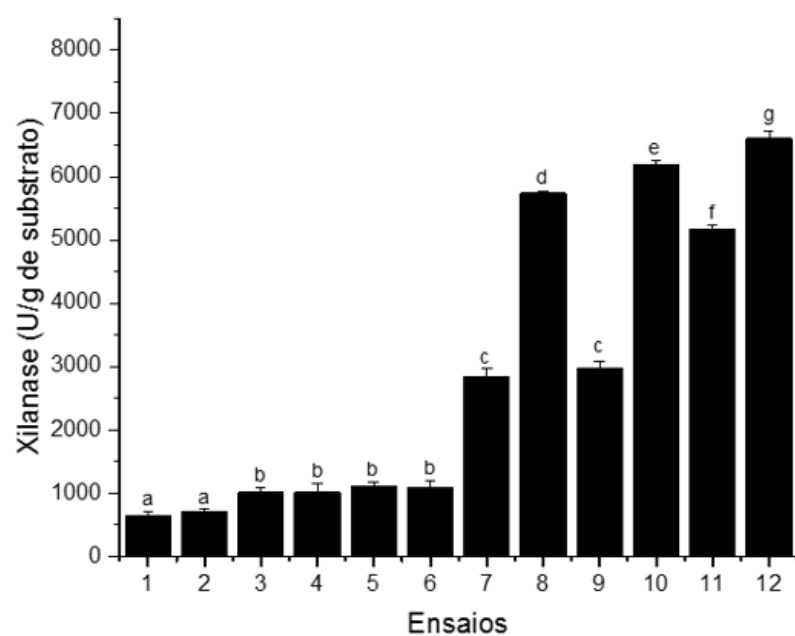


FIG. 3

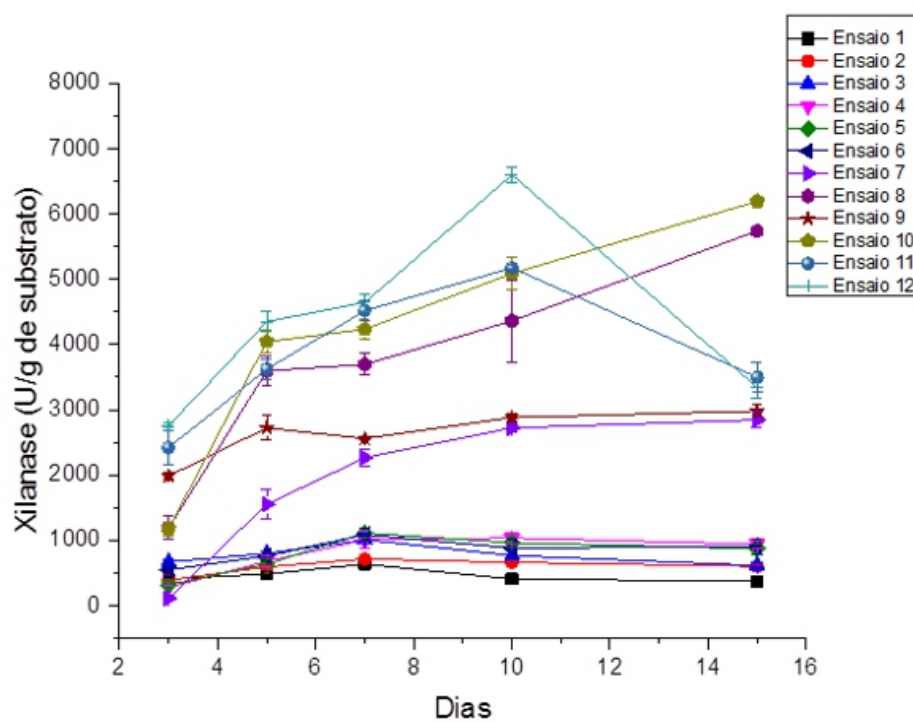


FIG. 4

FIG. 5

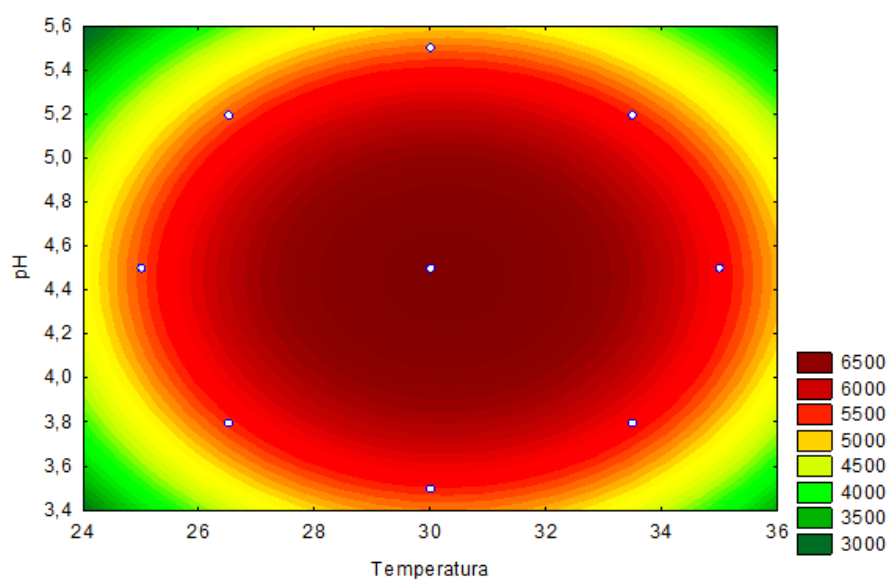
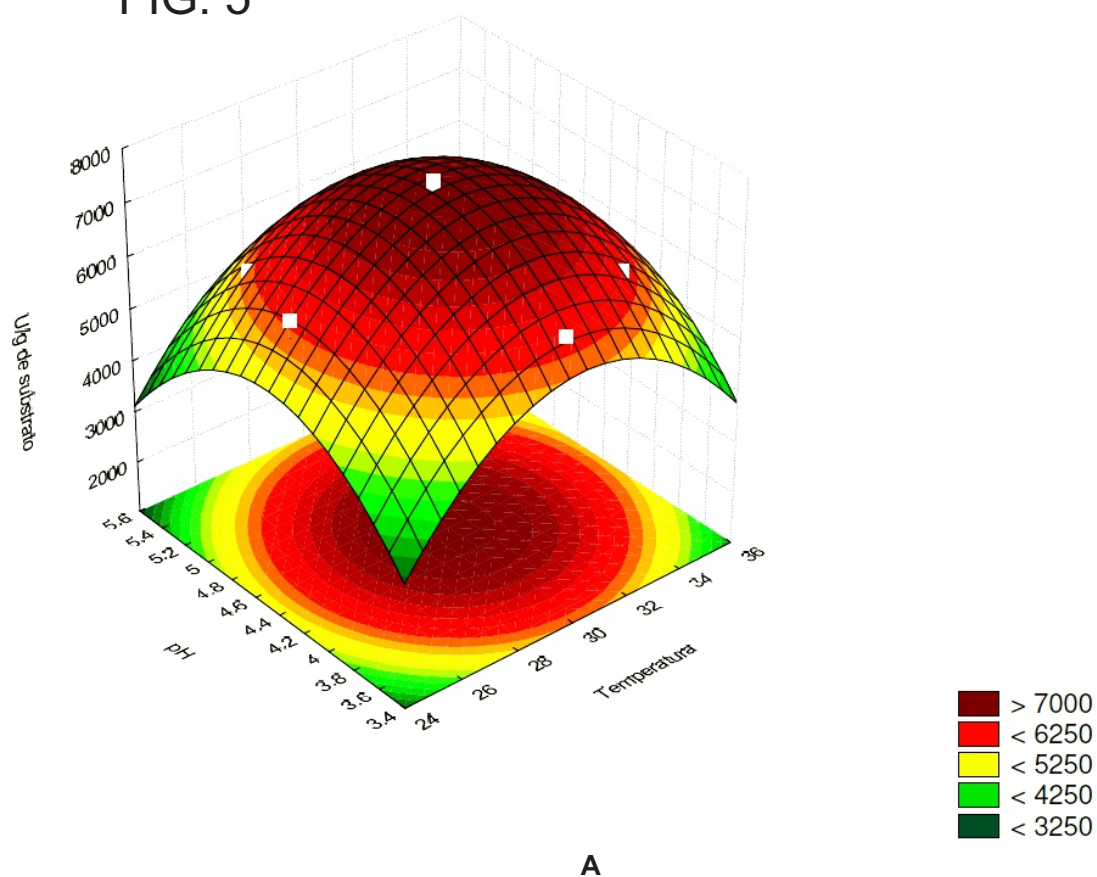


FIG.6

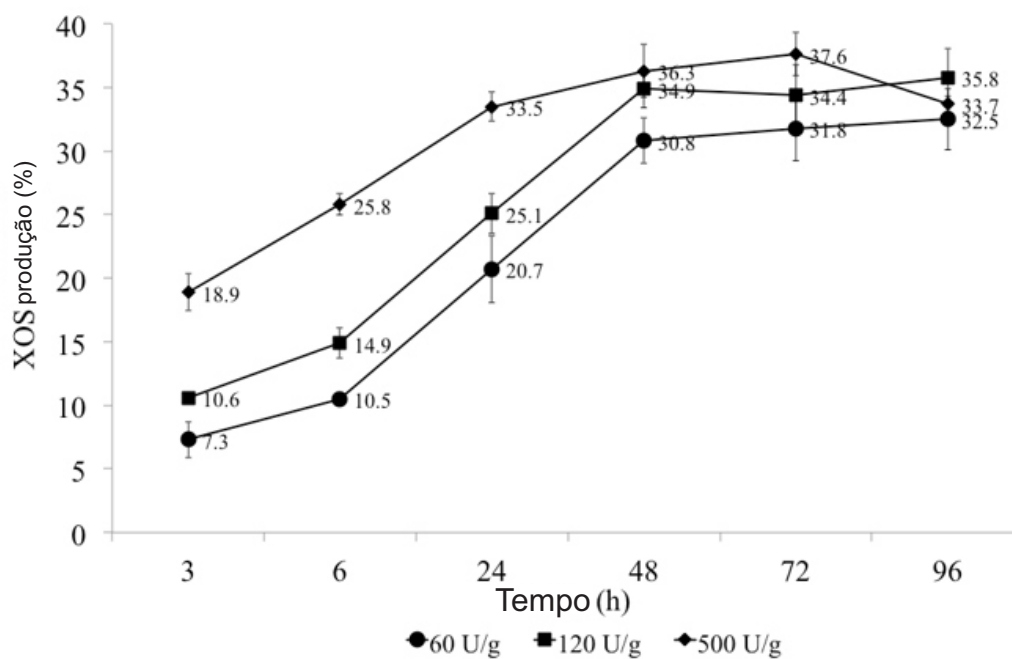
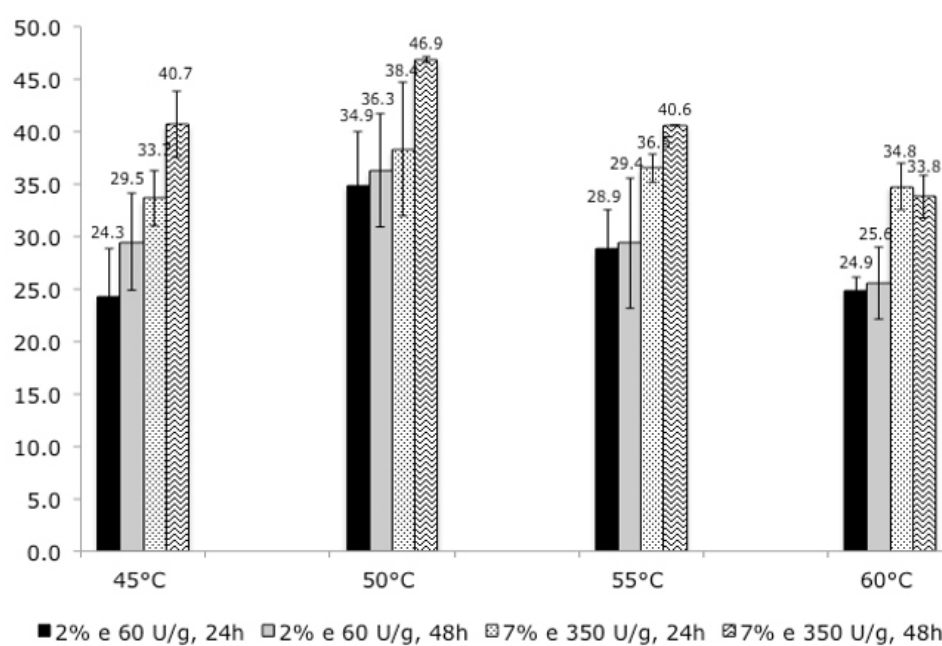


FIG.7



RESUMO

“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANASES VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO UTILIZANDO SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS”.

Trata a presente invenção de um processo para produção de enzimas xilanases via fermentação em estado líquido utilizando resíduos lignocelulósicos, com ou sem a presença de amidos, pré-tratados ou não, podendo ser complementado com sacarose e sais de baixo custo, via fermentação submersa com fungos lignocelulolíticos, sem modificação genética, que provê um extrato enzimático capaz de hidrolisar a hemicelulose, atingindo valores de produção de xilanase fúngica superiores ao estado da técnica e potencialmente útil nas empresas de papel e celulose, produção de etanol de segunda geração, produção de pré-bióticos, nutrição animal, clarificação de sucos, extração de óleo vegetal, entre outros.