



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

(11) PI 0816177-1 B1

(22) Data do Depósito: 29/08/2008

(45) Data de Concessão: 17/07/2018



(54) Título: PROCESSO PARA A CONVERSÃO DE UMA MATÉRIA-PRIMA LIGNOCELULÓSICA PRÉ-TRATADA EM AÇÚCARES SOLÚVEIS

(51) Int.Cl.: C12P 19/02; C12N 9/24; C12N 9/42; C12P 19/00

(30) Prioridade Unionista: 30/08/2007 US 60/969,046

(73) Titular(es): IOGEN ENERGY CORPORATION

(72) Inventor(es): BRIAN R. SCOTT; CHRISTOPHER HILL; JOHN TOMASHEK; CHENGSONG LIU

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO PARA A CONVERSÃO DE UMA MATÉRIA-PRIMA LIGNOCELULÓSICA PRÉ-TRATADA EM AÇÚCARES SOLÚVEIS**".

PEDIDOS RELACIONADOS

5 Esse pedido reivindica o benefício de prioridade de um pedido provisório Intitulado THE USE OF ACCESSORY ENZYMES IN A PROCESS FOR THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PRETREATED LIGNOCELLULOSIC FEEDSTOCKS, Pedido US 60/969.046, depositado em 30 de agosto de 2007.

10 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma mistura de enzimas de celulase. A presente invenção também se refere a um processo para a hidrólise de matérias-primas lignocelulósicas usando a mistura de enzimas de celulase.

15 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

 Matérias-primas lignocelulósicas são uma alternativa promissora ao amido de milho para a produção de etanol combustível. Matérias-primas lignocelulósicas são baratas, amplamente disponíveis e diversos estudos concluíram que o etanol celulósico gera emissões de gases do efeito estufa próximo a zero.

 Entretanto, matérias-primas lignocelulósicas não são facilmente quebradas em moléculas de açúcar que as compõem. A recalcitrância da lignocelulose pode ser parcialmente superada por pré-tratamento químico e/ou físico. Um exemplo de um pré-tratamento químico é a explosão de vapor na
25 presença de ácido sulfúrico diluído, (Patente US 4.461.648). Esse processo remove a maior parte da hemicelulose, mas há pouca conversão de celulose em glicose. O material pré-tratado pode ser então hidrolisado pelas enzimas de celulase.

 O termo celulase (ou enzimas de celulase) se refere, de modo geral,
30 a enzimas que catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas que se ligam a unidades de glicose individuais no polímero de celulose. O mecanismo catalítico envolve as ações sinérgicas de endoglucanases (E.C.3.2.1.4), celobio-

hidrolases (E.C.3.2.1.91) e β -glicosidase (E.C.3.2.1.21). As endoglucanases hidrolisam ligações glicosídicas acessíveis no meio de uma cadeia de celulose, enquanto as Celobiohidrolases liberam celobiose desses termos de cadeia processivamente. As β -glicosidases hidrolisam a celobiose em glicose e, ao fazerem isso, minimizam a inibição do produto das Celobiohidrolases. Coletivamente, as enzimas operam como um sistema que pode hidrolisar um substrato de celulose.

Enzimas de celulose podem ser obtidas de fungos filamentosos, incluindo *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Hypocrea* spp., *Humicola* spp., *Neurospora* spp., *Orpinomyces* spp., *Gibberella* spp., *Emmericella* spp., *Chaetomium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Magnaporthe* spp. e *Phanerochaete* spp.

Trichoderma spp. (*Trichoderma longibrachiatum* ou *Trichoderma reesei*) produz enzimas de celulase capazes de degradar a celulose cristalina. *Trichoderma reesei* secreta duas Celobiohidrolases, CBH1 (Cel7A) e CBH2 (Cel6A), as quais liberam celobiose de terminações redutoras e não redutoras da cadeia de celulose, respectivamente, e β -glicosidase (Cel3A). EG1 (Cel7B) e EG2 (Cel5A) são duas endocelulases principais envolvidas na hidrólise da celulose cristalina. CBH1 (Cel7A), CBH2 (Cel6A), EG1 (Cel7B) e EG2 (Cel5A) compreendem dois domínios funcionais – um domínio catalítico e uma molécula que se liga a carboidratos (CBM).

Das endoglucanases remanescentes, EG3 (Cel12A) carece de uma molécula que se liga a carboidratos e, assim, se liga à celulose cristalina de forma pobre (Karlsson et al., *Journal of Biotechnology*, 99:63- 78, (2002)). Relata-se que a EG5 (Cel45A) e EG6 (Cel74A) são uma glicomana-nase (Karlsson et al., 2002a) e uma xiloglucanase (Desmet et al., *FEBS Journal*, 274:356-363, (2006)), respectivamente. Relata-se que a EG4 (Cel61A) exibe alguma atividade sobre a carboximetil celulose, hidroxietil celulose e β -glucana (Karlsson et al., *European Journal of Biochemistry*, 268:6498-6507, (2002b)). Entretanto, quando comparada à EG1, a atividade específica da EG4 nesses substratos foi de quatro ordens de magnitude mais baixa, sugerindo que seu substrato nativo e/ou modo de ação se en-

contram em algum outro lugar. Ainda assim, a adição de Cel61A de *Thermoascus aurantiacus* à celulase de *Trichoderma* reportadamente aperfeiçoou a hidrólise de forragem de milho (WO 2005/074656). Isso também foi mostrado para Cel61B, Cel61C e Cel61D de *Thielavia terrestris* (WO 2005/074647).

A hidrólise enzimática de matérias-primas lignocelulósicas pré-tratadas é uma etapa ineficiente na produção de etanol celulósico e seu custo constitui uma das maiores barreiras à viabilidade comercial. Aperfeiçoar a atividade enzimática das celulasas ou aumentar a eficiência de produção de celulase é amplamente considerado uma oportunidade para significativa economia de custos.

Diversas abordagens foram tomadas para melhorar a atividade da celulase para a produção de etanol. A quantidade da atividade de β -glicosidase secretada por *Trichoderma* foi aumentada de modo a minimizar o acúmulo de celobiose e inibição do produto (Patente US 6.015.703). Estratégias de mutagênese têm sido utilizadas para melhorar a estabilidade térmica de CBH1 (US 2005/0277172) e CBH2 (US 2006/0205042). Estratégias de mutagênese e consenso de aminoácidos têm sido empregadas de modo a melhorar a atividade de CBH1 (US 2004/0197890) e CBH2 (US 2006/0053514). Uma proteína de fusão que consiste no domínio catalítico de Cel7A de *T. Reesei* e do domínio catalítico de EG1 de *Acidothermus cellulyticus* foi construída (US 2006/00057672). Adicionalmente, combinações originais de CBMs e domínios catalíticos de celulasas e hemicelulasas que se originam de *Myceliophthora*, *Humicola* e *Fusarium* foram gerados por em-
baralhamento de domínios em uma tentativa de gerar enzimas com novas especificidades e atividades enzimáticas (Patente US 5.763.254).

Essas abordagens focaram em componentes de celulase individuais, em particular naqueles que exibem atividade substancial em substratos de laboratório como papel de filtro, CMC, HEC e β -glucana. Embora alterem as propriedades de uma proteína individual, essas abordagens não aumentaram substancialmente a atividade do sistema de enzimas de celulase como um todo e, portanto, não reduziram o custo da enzima exigido para a

produção de etanol celulósico.

Alguns estudos testaram hemicelulases em conjunto com uma preparação de celulase para atividade aperfeiçoada em substratos lignocelulósicos (Berlin et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 97(2): 287-296, (2007)). Entretanto, pré-tratamentos eficazes de matérias-primas lignocelulósicas, como o processo de explosão em vapor, removem virtualmente toda a hemicelulose, sugerindo fortemente que o aperfeiçoamento da atividade de hemicelulases não é a melhor abordagem para reduzir os custos da celulase.

Alguns componentes da celulase de *Trichoderma* possuem atividade hidrolítica desprezível em substratos miméticos de celulose de laboratório, mas são induzidos por celulose. Cip1 e Cip2 são induzidos por celulose e soforose, o que implica no fato de que eles possuem papéis na quebra da biomassa celulósica, porém suas atividades são desconhecidas (Foreman et al., *Journal of Biological Chemistry*, 278(34) 31988-31997, (2003)). Mostrou-se que a Swollenin (Swol), uma proteína fúngica nova que contém um domínio de expansão e um CBM mostrou que quebra fibras de algodão (Saloheimo et al., *European Journal of Biochemistry*, 269:4202-4211, (2002)), presumidamente através da quebra de ligações de hidrogênio na estrutura de celulose.

Apesar de diversos esforços de pesquisa, ainda há uma necessidade de uma mistura de enzimas de celulase aperfeiçoada para a hidrólise de celulose em uma matéria-prima lignocelulósica pré-tratada. A ausência de tal mistura de enzimas representa um grande obstáculo na comercialização da conversão de celulose em açúcares orgânicos, incluindo glicose para a produção de etanol e outros produtos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma mistura enzimática de celulase. A presente invenção também proporciona um processo para a hidrólise de matérias-primas lignocelulósicas usando a mistura de enzimas de celulase.

É um objetivo da presente invenção proporcionar uma mistura

de enzimas aperfeiçoada para a hidrólise enzimática de matéria-prima lignocelulósica.

Os inventores descobriram que o ajuste das razões de enzimas acessórias, a saber, EG4, Swollenin e Cip1, com relação uma a outra em uma mistura enzimática de celulase pode aperfeiçoar a hidrólise de matérias-primas lignocelulósicas pré-tratadas. Por exemplo, descobriu-se que a inclusão de EG4 em uma mistura de enzimas de celulase em uma concentração fracionária (p/p) para cada uma de EG4, Swollenin e Cip1 como uma função da quantidade total de EG4, Swollenin e Cip1 na mistura de enzimas de celulase) de cerca de 0,25 a cerca de 0,83-, Swollenin em uma concentração fracionária de cerca de 0 a cerca de 0,66 e Cip1 em uma concentração fracionária de 0 a cerca de 0,33, pode melhorar significativamente a hidrólise de uma matéria-prima lignocelulósica com relação à composição enzimática tipo selvagem. Trabalhos anteriores não testaram razões variáveis de tais componentes acessórios em combinação na hidrólise de matéria-prima lignocelulósica pré-tratada, mas focaram em melhorar a atividade enzimática através da modulação dos níveis de componentes de celulase individuais.

Assim, de acordo com um primeiro aspecto da invenção, é proporcionada uma mistura enzimática de celulase isolada para hidrolisar uma matéria-prima lignocelulósica pré-tratada em açúcares solúveis, que compreende uma mistura de celulasas primárias que compreendem CBH1, CBH2, EG1 e EG2 e uma mistura enzimática acessória que compreende EG4 em uma concentração fracionária (f_{EG4}) de cerca de 0,09 a cerca de 0,91 (p/p), por exemplo de cerca de 0,25 a cerca de 0,83 (p/p); Swollenin em uma concentração fracionária (f_{Swol}) de cerca de 0,09 a cerca de 0,091 (p/p), por exemplo de cerca de 0 a cerca de 0,66; e Cip1 em uma concentração fracionária (f_{Cip1}) de 0 a cerca de 0,42 (p/p), por exemplo de cerca de 0 a cerca de 0,33, cujas concentrações fracionárias são medidas com relação ao peso total de enzimas de EG4, Swollenin e Cip1 presentes na mistura enzimática de celulase.

De acordo com um segundo aspecto da invenção, é fornecido

um processo para converter uma matéria-prima lignocelulósica pré-tratada em açúcares solúveis que compreende hidrolisar enzimaticamente a matéria-prima lignocelulósica pré-tratada com a mistura de enzimas de celulase conforme definida acima.

- 5 De acordo com um terceiro aspecto da invenção, é proporcionado um método para hidrolisar uma matéria-prima lignocelulósica em açúcares solúveis usando a mistura de celulasas, conforme definido acima.

De acordo com modalidades de cada aspecto da invenção, a mistura de enzimas compreende enzimas de celulase primárias CBH1, CBH2, EG1 e EG2. As enzimas de celulase primárias podem possuir um teor combinado de cerca de 70% a cerca de 95% em peso, e as enzimas acessórias podem possuir um teor combinado de cerca de 5 a cerca de 30% em peso relativo ao peso percentual total das enzimas de celulase primárias e enzimas acessórias presentes na mistura de enzimas. As enzimas de celulase primárias podem possuir um teor combinado de cerca de 70 a cerca de 90% em peso, e as enzimas acessórias podem possuir um teor combinado de cerca de 10 a cerca de 30% em peso relativo ao peso percentual total das enzimas de celulase primárias e enzimas acessórias presentes na mistura de enzimas.

- 20 Em modalidades de quaisquer dos aspectos anteriores da invenção, as enzimas primárias e acessórias possuem um teor combinado de cerca de 70 a cerca de 100% em peso, medido com relação ao total de proteína presente na mistura enzimática.

As enzimas CBH1 e CBH2 podem possuir um teor combinado de cerca de 55 a cerca de 85% em peso, as enzimas EG1 e EG2 podem possuir um teor combinado de cerca de 15 a cerca de 45% em peso, medido em relação ao peso total combinado das enzimas CBH1, CBH2, EG1 e EG2 presentes na mistura de enzimas de celulase. Em uma modalidade da invenção, as enzimas CBH1 e CBH2 podem, cada uma, estar presentes em uma concentração fracionária de cerca de 0,25 a cerca de 0,75 (p/p) medido com relação ao peso total combinado das enzimas CBH1 e CBH2 presentes na mistura de enzimas de celulase. Em outra modalidade da invenção, as

enzimas EG1 e EG2 podem, cada uma, estar presentes em uma concentração fracionária de cerca de 0,35 a cerca de 0,95 (p/p) e cerca de 0,05 a cerca de 0,65 (p/p) medido com relação ao peso total combinado das enzimas EG1 e EG2 presentes na mistura de enzimas de celulase.

5 Em modalidades da invenção, a enzima EG4 está presente em uma concentração fracionária de cerca de 0,33 a cerca de 0,50, a enzima Swollenin está presente em uma concentração fracionária de cerca de 0,33 a cerca de 0,58, e Cip1 está presente em uma concentração fracionária de cerca de 0,08 a cerca de 0,25 com relação ao peso total de enzimas de
10 EG4, Swollenin e Cip1 presentes na mistura de enzimas de celulase.

As enzimas primárias e acessórias podem ser expressas a partir de sequências de codificação de origem fúngica. Uma fonte fúngica pode ser um fungo *Ascomycete* ou *Basidiomycete*. A fonte fúngica é selecionada de
15 *Trichoderma ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Hypocrea ssp.*, *Humicola ssp.*, *Neurospora ssp.*, *Orpinomyces ssp.*, *Gibberella ssp.*, *Emmericella ssp.*, *Chaetomium ssp.*, *Fusarium ssp.*, *Penicillium ssp.*, *Magnaporthe ssp.*, e *Phanerochaete ssp.* A fonte fúngica pode ser *Trichoderma ssp.*.

As enzimas primárias e acessórias podem ser produzidas por expressão em um organismo endógeno a partir do qual as enzimas primárias e acessórias são derivadas. Alternativamente, as enzimas primárias e
20 acessórias podem ser produzidas por expressão em um organismo heterólogo. Por exemplo, as enzimas primárias e acessórias são produzidas por expressão em *Trichoderma reesei*.

A mistura de enzimas de celulase pode ser uma mistura de enzimas secretadas de uma fonte microbial. De acordo com essa modalidade,
25 as enzimas primárias e acessórias constituem entre cerca de 70 e cerca de 100% em peso das enzimas secretadas na mistura, e enzimas não celulase adicionais constituem entre 0 e cerca de 30% em peso do total de enzimas secretadas na mistura. As enzimas não celulase adicionais secretadas na
30 mistura inclui β -glicosidase.

De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionada uma mistura de enzimas de celulase para hidrolisar uma matéria-prima lignocelu-

lósica pré-tratada em açúcares solúveis que compreende uma mistura de enzimas primárias compreendendo CBH1, CBH2, EG1 e EG2 e uma mistura de enzimas acessórias que compreende as enzimas acessórias EG4, Swollenin e Cip1, cada uma das enzimas acessórias EG4, Swollenin e Cip1 está presente em uma concentração fracionária (fEG4, fSwol, fCip1) medida em relação a todas as enzimas acessórias presentes na mistura enzimática de celulase que proporciona um aperfeiçoamento na atividade em uma matéria-prima lignocelulósica pré-tratada de pelo menos 10%, em relação a uma mistura de enzimas nativa secretada por *Trichoderma reesei* do tipo selvagem, aqui definida como Mistura de Referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra um gel SDS-PAGE de componentes acessórios e primários purificados após visualização com corante Azul de Coomassie. Uma celulase de *Trichoderma* comercial e padrões de massa molecular são mostrados a título de referência. A análise de densitometria deste gel indica que os componentes purificados são substancialmente puros. As preparações de CBH1 e CBH2 eram de pureza superior a 95%. EG1, EG2, Swol e Cip1 eram de pureza superior a 90%.

A figura 2 mostra uma análise de Western blot dos componentes primários e acessórios purificados. Estes foram separados por SDS-PAGE, eletro-transferidos para uma membrana PVDF e visualizados usando anticorpos policlonais específicos aos componentes. Essa é uma técnica mais sensível para detectar uma contaminação cruzada potencial dos componentes purificados. Isto também demonstrou que todos esses componentes eram substancialmente isentos de contaminação cruzada de celulasas primárias.

A figura 3 mostra uma representação gráfica ternária das atividades enzimáticas de uma mistura de celulase primária com diversas misturas de EG4, Swollenin e Cip1. A mistura de celulase primária é composta de 32% em peso de CBH1, 47% em peso de CBH2, 17% em peso de EG1 e 4% em peso de EG2 (com relação ao peso total de todas as celulasas primárias). A mistura de celulasas primárias foi combinada com as misturas de

componentes acessórios em uma composição final que consistiu em 82% em peso da mistura de celulasas primárias e 18% em peso da mistura de componentes acessórios. As atividades enzimáticas são plotadas em diversas concentrações fracionárias de EG4(f_{EG4}), Swollenin (f_{Swol}) e Cip1 (f_{Cip1}) relativas à concentração total de componentes acessórios. Os valores de atividade mostrados são expressos com relação à atividade da mistura de celulasas primárias sem a mistura de componentes acessórios, baseado em uma massa de proteína equivalente. A composição de componentes acessórios de uma celulase de *Trichoderma* comercial é mostrada a título de comparação ('Mistura de Referência'). Uma composição ótima modelo de EG4, Swol e Cip1 foi determinada pela modelagem das atividades das misturas de componentes acessórios únicas e binárias usando a Equação 1. Essa foi rotulada como "Mistura Modelo Ótima".

A figura 4 mostra misturas de componentes acessórios com atividade significativamente mais alta que a mistura de referência (1,16). As atividades destas misturas são maiores que ou iguais a 1,23. Essa região de espaço de mistura ternário é referida aqui por Zona 1.

A figura 5 mostra misturas de componentes acessórios com a mais alta atividade. As atividades destas misturas são maiores que ou iguais a 1,30. Essa região de espaço de mistura ternário é referida aqui como Zona 2.

A figura 6 mostra as atividades das misturas de celulasas compostas por diferentes razões de componentes de celulase primários em relação aos componentes acessórios totais, usando uma razão otimizada de componentes acessórios definida na presente invenção. A mistura de celulase primária é composta de 32% em peso de CBH1, 47% em peso de CBH2, 17% em peso de EG1 e 4% em peso de EG2 (com relação ao peso total de todas as celulasas primárias), ao passo que a mistura de enzimas acessórias era composta por 42% em peso de EG4, 41% em peso de Swol e 17% em peso de Cip1 (relativo ao peso total de todas as enzimas acessórias). O percentual combinado de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 (%PC) em uma celulase de *Trichoderma* comercial é rotulado nessa figura de "razão de referência".

A figura 7 mostra a conversão de substrato lignocelulósico pré-tratado versus o tempo por diferentes misturas de componentes de celulase. Uma mistura de referência de componentes acessórios foi comparada a uma mistura ótima de componentes acessórios quando adicionada a uma mistura de componentes primários. A performance de uma mistura de celulasas primárias sem EG4, Swol ou Cip1 é mostrada a título de referência. A dose de proteína total de cada mistura usada neste ensaio foi equivalente. Ambos os gráficos (painéis A e B) têm o mesmo resultado, exceto pelo fato de que no painel B, os eixos foram mudados para a forma logarítmica.

10 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma mistura de enzimas de celulase. A presente invenção também proporciona um processo para a hidrólise de uma matéria-prima lignocelulósica usando a mistura de enzimas de celulase.

15 A presente invenção se refere a uma mistura de enzimas de celulase que compreende enzimas acessórias e de celulasas primárias para serem usadas na hidrólise de uma matéria-prima lignocelulósica pré-tratada. "Enzimas acessórias" ou "componentes acessórios" são definidos aqui como Swollenin (Swol), Cip1 e a endoglucanase, EG4. "Enzimas de celulase primárias", "celulasas primárias", "componentes primários" ou "PC" são definidos aqui como a Celobiohidrolase, CBH1 e CBH2, e as endoglucanases, EG1 e EG2. Adicionalmente às celulasas primárias, CBH1, CBH2, EG1 e EG2, e as enzimas acessórias, EG4, Swollenin e Cip1, a mistura de enzimas de celulase pode compreender enzimas adicionais que incluem outras Celobiohidrolases ou endoglucanases e hemicelulasas, bem como componentes de enzimas de β -glicosidase conforme descrito em mais detalhes aqui.

As seguintes definições se referem à classificação de celobiohidrolases, endoglucanases e β -glicosidases, conforme definido pela Joint Commission on Biochemical Nomenclature of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Publicado em *Enzyme Nomenclature* 1992, Academic Press, San Diego, Califórnia, ISBN 0-12-227164-5; com suplementos em *Eur. J. Biochem.* 1994, 223, 1-5; *Eur. J. Biochem.* 1995, 232, 1-6;

Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; *Eur. J. Biochem.* 1997, 250, 1-6, e *Eur. J. Biochem.* 1999, 264, 610- 65; vide também: chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme) e às famílias de glico-hidrolases de celulases e β -glicosidases conforme definidas pelo sistema CAZy, o qual é aceito como nomenclatura padrão para enzimas de glico-hidrolase (Coutinho, P.M. & Henrissat, B., 1999, "Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach." Em *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, HJ. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat e B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12, vide também: afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/) e é familiar aos versados na técnica.

- 10 "EG4" é uma enzima ativa de carboidrato expressa a partir de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio catalítico da Família 61 de glico-hidrolase (GH) sob EC 3.2.1.4 ou qualquer proteína, polipeptídeo ou fragmento destes com 40% a 100%, por exemplo, de 50% a 100% de identidade de sequência de aminoácidos em relação à sequência
- 15 altamente conservada do aminoácido 144 ao aminoácido 163 da enzima de EG4 de *Trichoderma reesei* (Número de acesso no GenBank CAA71999 e anotado como endoglucanase IV de *Hypocrea jecorina*). Por exemplo, a enzima de EG4 pode ser obtida ou derivada de quaisquer organismos listados na Tabela 1, o qual demonstra pelo menos 40% de identidade com os ami-
- 20 noácidos 144-163 da EG4 de *Trichoderma reesei*. A EG4 pode ser funcionalmente ligada a um módulo que liga carboidratos (CBM) com alta afinidade para a celulose cristalina, como o domínio de ligação de celulose da Família 1.

25 Tabela 1: Identidade de sequência de enzimas de EG4 em relação à EG4 de *Trichoderma reesei*

Organismo	Proteína	Acesso no GenPept	% de identidade com EG4 (AA 144-163) de <i>T. reesei</i>
<i>Neurospora crassa</i>	Endoglucanase IV (NCU07760.1)	EAA29018	80
<i>Thielavia terrestris</i>	Cel61C	ACE10232	75
<i>Gibberella zeae</i>	Cel61E	XP_383871	75
<i>Thielavia terrestris</i>	Cel61D	ACE10233	70
<i>Trichoderma reesei</i>	Cel61B	AAP57753	65
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F1767	Cel61A	AAM22493	65

Continuação

Organismo	Proteína	Acesso no GenPept	% de identidade com EG4 (AA 144-163) de <i>T. reesei</i>
<i>Thielavia terrestris</i>	Cel61B	ACE10231	60
<i>Aspergillus kawaxhii</i>	Cel61A	BAB62318	52
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	Endo- β 1,4-glucanase (AN1602.2)	EAA64722	52
<i>Thielavia terrestris</i>	Cel61E	ACE10234	50
<i>Gibberella zeae</i>	Sequência 122805 da Patente US 7214786	ABT35335	45
<i>Thielavia terrestris</i>	Cel61G	ACE10235	40

*Para a Eg4 de *T. Reesei*, o aminoácido 1 é o primeiro aminoácido da enzima secretada, de tal modo que os primeiros 8 aminoácidos são HGHINDIV.

"Swollenin" ou "Swol" é aqui definida como qualquer proteína, polipeptídeo ou fragmento destes com cerca de 70% a 100% de identidade de sequência de aminoácidos, ou, por exemplo, cerca de 75% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos em relação aos aminoácidos 92 a 475 (que compreende o domínio tipo expansina e seu CBM associado, mas não possui o CBM de família 1 e o peptídeo ligante) da enzima de Swollenin de *Trichoderma reesei* (Número de acesso no GenBank CAB92328 e anotado como Swollenin de *Hypocrea jecorina*). Por exemplo, a enzima de Swollenin pode ser obtida ou derivada de quaisquer organismos listados na Tabela 2, o que demonstra pelo menos cerca de 70% de identidade com os aminoácidos 92-475 da enzima de Swollenin de *Trichoderma reesei*. Por exemplo, a Swollenin pode ser funcionalmente ligada a um módulo que liga carboidratos (CBM) com alta afinidade para a celulose cristalina, como o domínio de ligação de celulose da Família 1.

Tabela 2: Identidade de sequência de enzimas de Swollenin em relação a Swollenin de *Trichoderma reesei*

Organismo	Proteína	Acesso no GenPept	% de Identidade com Swollenin (AA 92-475) de <i>T. reesei</i> *
<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	Swollenin	ABV57767	95,8
<i>Trichoderma asperellum</i>	Swollenin	ACB05430	92,4
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	Proteína de Domínio de Ligação de Celulose Fúngica	XP_001257521	74,0
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	Swollenin	XP_746648	70,2

*Para a Swollenin de *T. Reesei*, o aminoácido 1 é o primeiro aminoácido da enzima secretada, de tal modo que os primeiros 8 aminoácidos são QQNCAALF.

"Cip1" é aqui definida como qualquer proteína, polipeptídeo ou fragmento destes com cerca de 40% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos, ou, por exemplo, cerca de 56% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos em relação aos aminoácido 1 a 212 que compreende o domínio catalítico da enzima de Cip1 de *Trichoderma reesei* (Número de acesso no GenBank AAP57751 e anotado como Cip1 de *Hypocrea jecorina*). Por exemplo, a enzima de Cip1 pode ser obtida ou derivada de quaisquer organismos listados na Tabela 3, o qual demonstra pelo menos cerca de 40% de identidade com os aminoácidos 1-212 da enzima de Cip1 de *Trichoderma reesei*. Por exemplo, a Cip1 pode ser funcionalmente ligada a um módulo que liga carboidratos (CBM) com alta afinidade para a celulose cristalina, como o domínio de ligação de celulose da Família 1.

Tabela 3: Identidade de sequência de enzimas de Cip1 em relação a Cip1 de *Trichoderma reesei*

Organismo	Proteína	Acesso no GenPept	% de Identidade com Cip1 (aa 1-212) de <i>T. reesei</i> *
<i>Pyenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	Cip1	XP_001937765	56,9
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Hidrolase Secretada Putativa	CAA18323	39,6
<i>Herptosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779	Proteína II da Família de Ligação à Celulose	YP_001545140	38,8

*Para a Cip1 de *T. Reesei*, o aminoácido 1 é o primeiro aminoácido da enzima secretada, de tal modo que os primeiros 8 aminoácidos são QISDDFES...

"CBH1" é uma enzima ativa de carboidrato expressa a partir de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio catalítico da família 7 de glico-hidrolase (GH) classificado sob EC 3.2.1.91 ou qualquer proteína, polipeptídeo ou fragmento destes com cerca de 60% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos, ou por exemplo cerca de 65% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos em relação ao domínio catalítico (aminoácidos de 1 a 437) da enzima de CBH1 de *Trichoderma reesei* (Número de acesso no GenBank CAH10320 e anotado como CBH1 de *Hypocrea jecorina*). Por exemplo, a enzima de CBH1 pode ser obtida ou derivada de quaisquer organismos listados na Tabela 4, o que demonstra pelo menos cerca de 60% de identidade com os aminoácidos 1 a

437 da enzima de CBH1 de *Trichoderma reesei*. Por exemplo, a CBH1 pode ser funcionalmente ligada a um módulo que liga carboidratos (CBM) com alta afinidade para a celulose cristalina, como o domínio de ligação de celulose da Família 1.

5 Tabela 4: Identidade de sequência de enzimas de CBH1 em relação a CBH1 de *Trichoderma reesei*

Organismo	Proteína	Acesso no GenPept	% de Identidade com CBH1 (1-437) de <i>T. reesei</i> *
<i>Hypocrea koningii</i> G-39	Celobiohidrolase (Cbh1) – Cel7A	CAA49596	100,00
<i>Trichoderma viride</i> AS 3.3711	Celobiohidrolase I	AAQ76092	99,3
<i>Trichoderma viride</i>	1,4-beta-D-glucana Celobiohidrolase	CAA37878	96,1
<i>Trichoderma harzianum</i>	Celobiohidrolase	AAF36391	81,9
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	1,4-beta-D-glucana Precursor de Celobiohidrolase A	AAF04491	65,5
<i>Talaromyces emersonii</i>	Celobiohidrolase 1-Cel7A	AAL33603	65,0
<i>Thermoascus aurantiacus</i> var. <i>levisporus</i>	Precursor de Celobiohidrolase	AAW27920	64,6
<i>Aspergillus oryzae</i> KBN616	Celobiohidrolase C	BAC07255	63,8
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Precursor de Celobiohidrolase	AAL16941	63,2
<i>Penicillium occitanis</i>	Celobiohidrolase I	AAT99321	63,2
<i>Penicillium funiculosum</i>	Xilanase/Celobiohidrolase	CAC85737	63,0
<i>Cryphonectria parasitica</i> EP155	Celobiohidrolase	AAB00479	62,6
<i>Acremonium thermophilum</i> ALKO4245	Celulose 1,4-beta-celobiosidase	CAM98445	62,5
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	1,4-beta-D-glucana, precursor Celobiohidrolase B	AAF04492	61,8
<i>Neurospora crassa</i> or74a	Precursor de Exoglucanase 1	EAA33262	61,0
<i>Penicillium chrysogenum</i> FS010	Exo-Celobiohidrolase	AAV65115	60,8
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB 40	Celobiohidrolase D	BAE61042	60,4

*Para a CBH1 de *T. Reesei*, o aminoácido 1 é o primeiro aminoácido da enzima secretada, de tal modo que os primeiros 8 aminoácidos são QSACTLQS.

"CBH2" é definida como uma enzima ativa de carboidrato expressa a partir de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio catalítico da família 6 de glico-hidrolase (GH) classificado sob EC 3.2.1.91 ou qualquer proteína, polipeptídeo ou fragmento destes com cerca de 45% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos, ou por exemplo cerca de 60% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos em relação aos aminoácidos 83 a 447 que compreendem o domínio catalítico da enzima de CBH2 de *Trichoderma reesei* (Número de acesso no GenBank AAA34210 e anotado como celobiohidrolase II de Hy-

- pocrea jecorina*). Por exemplo, a enzima de CBH2 pode ser obtida ou derivada de quaisquer organismos listados na Tabela 5, o qual demonstra pelo menos cerca de 45% de identidade com os aminoácidos 83-447 da enzima de CBH2 de *Trichoderma reesei*. A CBH2 pode ser funcionalmente ligada a um módulo que liga carboidratos (CBM) com alta afinidade para a celulose cristalina, como o domínio de ligação de celulose da Família 1.

Tabela 5: Identidade de sequência de enzimas de CBH2 em relação a CBH2 de *Trichoderma reesei*

Organismo	Proteína	Acesso no GenPept	% de Identidade com CBH2 (AA 83-447) de <i>T. reesei</i>
<i>Hypocrea koningii</i>	Celobiohidrolase II (Cbh2)	AAK01367.1	98,9
<i>Trichoderma viride</i> CICC 13038	Celobiohidrolase II (CbhII; Cbh2)	AAQ76094.1	98,9
<i>Hypocrea koningii</i> 3.2774	Celobiohidrolase II (Cbh2; CbhII)	ABF56208.1	98,1
<i>Hypocrea koningii</i> AS3.2774	Cbh2	ABG48766.1	97,8
<i>Trichoderma parceramosum</i>	Celobiohidrolase II (CbhII)	AAU05379.2	97,8
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	Celobiohidrolase (AN5282.2)	ABF50873.1	72,4
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	An12g02220	CAK41068.1	72,4
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB 40	AO090038000439	BAE64227.1	67,8
<i>Aspergillus</i> CBS 513.88	An08g01760	CAK39856.1	67,7
<i>Acremonium cellulolyticus</i> Y-94	Celobiohidrolase II (Acc2)	AAE50824	67,3
<i>Talaromyces emersonii</i>	Celobiohidrolase II (CbhII)	AAL78165.2	66,8
<i>Gibberella zeae</i> K59	Ce16 – Ce16	AAQ72468.1	66,1
<i>Fusarium oxysporum</i>	Endoglucanase B	AAA65585.1	66,1
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	NCU09680.1(64C2.180)	CAD70733.1	65,9
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	AN1273.2	EAA65866.1	65,5
<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	MG05520.4	XP_360146.1	65,4
<i>Chaetomium thermophilum</i> CT2	Celobiohidrolase II	AAW64927.1	65,0
<i>Humicola insolens</i>	Avicelase 2 (Avi2)	BAB39154.1	63,7
<i>Cochliobolus eterstrophus</i>	Celobiohidrolase II (CEL7)	AAM76664.1	59,6
<i>Agaricus bisporus</i> D649	Celobiohidrolase II (Ce13; Ce13A)	AAA50607.1	57,7
<i>Lentinula edodes</i> Stamets CS-2	Celulase – Ce16B	AAK95564.1	56,3
<i>Lentinula edodes</i> L54	Celobiohidrolase (cBHii-i)	AAK28357.1	56,0
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	Unnamed protein product	CAH05679.1	54,9
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Celobiohidrolase II	AAB32942.1	54,9
<i>Volvariella volvacea</i>	Celobiohidrolase II-I (CbhII-I)	AAT64008.1	53,8
<i>Chrysosporium lucknowense</i>	Celobiohidrolase (EG6; CBH II) – Ce16A	AAQ38151.1	49,5
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Celobiohidrolase II	AAL15037.1	47,2
<i>Trametes versicolor</i>	ORF	AAF35251.1	47,0
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	NCU03996.1	XP_323315.1	46,8
<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	MG04499.4	XP_362054.1	45,1

*Para a CBH2 de *T. Reesei*, o aminoácido 1 é o primeiro aminoácido da enzima secretada, de tal modo que os primeiros 8 aminoácidos são QAACSSVWG.

"EG1" é uma enzima ativa de carboidrato expressa a partir de

uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio catalítico da família 7 de glico-hidrolase (GH) classificado sob EC 3.2.1.4 ou qualquer proteína, polipeptídeo ou fragmento destes com cerca de 40% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos, ou por exemplo cerca de 48% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos em relação aos aminoácidos 1 a 374 que compreendem o domínio catalítico da enzima de EG1 de *Trichoderma reesei* (Número de acesso no GenBank AA-A34212 e anotado como endoglucanase I de *Hypocrea jecorina*). Por exemplo, a enzima de EG1 pode ser obtida ou derivada de quaisquer organismos listados na Tabela 6, o que demonstra pelo menos cerca de 40% de identidade com os aminoácidos 1-374 da enzima de EG1 de *Trichoderma reesei*. A EG1 é funcionalmente ligada a um módulo que liga carboidratos (CBM) com alta afinidade a uma celulose cristalina, como o domínio de ligação de celulose da Família 1.

Tabela 6: Identidade de sequência de enzimas de EG1 em relação a EG1 de *Trichoderma reesei*

Organismo	Proteína	Acesso no GenPept	% de Identidade com EG1 (aa 1-374) de <i>T. reesei</i> *
<i>Trichoderma viride</i> AS 3.3711	Endoglucanase I	AAQ21382	99,5
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Endo-1,4-glucanase I	CAA43059	95,5
<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	Endoglucanase I	ABM90986	95,2
<i>Penicillium decumbens</i> 114-2	Endoglucanase I	ABY56790	62,5
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB 40	Endo-1,4-glucanase	BAE66197	49,1
<i>Aspergillus oryzae</i> KBN616	Endo-1,4-glucanase	BAA22589	48,9
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	precursor de Endo-glucanase EG-1	EAA27195	48,7
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	Endo- β -1,4-glucanase	EAA63386	47,9
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	Proteína Hipotética	XP_324211	41,7

*Para a EG1 de *T. Reesei*, o aminoácido 1 é o primeiro aminoácido da enzima secretada, de tal modo que os primeiros 8 aminoácidos são QPQGTSTP.

"EG2" é definida como uma enzima ativa de carboidrato expressa a partir de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio catalítico da família 5 de glico-hidrolase (GH) classificado sob EC 3.2.1.4 ou qualquer proteína, polipeptídeo ou fragmento destes com cerca de 40% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos, ou por exemplo cerca de 48% a cerca de 100% de identidade de sequência de aminoácidos em relação aos aminoácidos 202 a 222 da enzima de EG2 de *Trichoderma* (Número de acesso no GenBank AAA34213 e anotado como endoglucanase

III de *Hypocrea jecorina*). A região altamente conservada representada pelos aminoácidos 202 a 222 da sequência de aminoácidos de EG2 de *Trichoderma reesei* inclui um dos dois resíduos de ácido glutâmico catalítico que caracterizam a Família 5 de GH. Por exemplo, a enzima de EG1 pode ser obtida ou derivada de quaisquer organismos listados na Tabela 7, o qual demonstra pelo menos cerca de 40% de identidade com os aminoácidos 2—222 da enzima de EG2 de *Trichoderma reesei*. A EG2 pode ser funcionalmente ligada a um módulo que liga carboidratos (CBM) com alta afinidade para a celulose cristalina, como o domínio de ligação de celulose da Família 1.

Tabela 7: Identidade de sequência de enzimas de EG2 em relação a EG2 de *Trichoderma reesei*

Organismo	Proteína	Acesso no GenPept	% de Identidade com EG2 (aa 202-222) de <i>T. reesei</i> *
<i>Trichoderma viride</i>	Endoglucanase	ABQ95572	100
<i>Trichoderma viride</i> AS 3.3711	Endoglucanase III	AAQ21383	100
<i>Trichoderma viride</i> MC300-1	Endo-1,4-glucanase II	BAA36216	100
<i>Trichoderma</i> sp. C-4	Endo-1,4-glucanase	AAR29981	92
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Endoglucanase – Ce15A	AAU12275	72
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Endo-1,4-glucanase	AAB03889	64
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	Carboximetilcelulase	ABP02069	56
<i>Cryptococcus flavus</i>	Carboximetilcelulase	AAC60541	50
<i>Irpex lacteus</i> MC-2	Endoglucanase	BAD67544	48
<i>Hypocrea jecorina</i> QM6a	Ce15B	AAP57754	48
<i>Macrophomina Phaseolina</i>	Endo-1,4-glucanase	AAB51451	44
<i>Thermoascus aurantiacus</i> IFO 9748	Precursor EGI	AAL16412	44
<i>Trametes hirsuta</i>	Endoglucanase	BAD01163	44
<i>Aspergillus oryzae</i>	Endo-1,4-glucanase (Ce1E)	BAD72778	44
<i>Talaromyces emersonii</i>	Endo-1,4-glucanase	AAL33630	40
<i>Humicola grisea</i> var. <i>Thermoidea</i> IFO9854	Celulase (Endo-1,4-glucanase 3)	BAA12676	40
<i>Humicola insolens</i>	Endo-1,4-glucanase IV	CAA53631	40
<i>Aspergillus kawachi</i>	Endoglucanase C (Ce15B)	BAB62319	40
<i>Aspergillus nidulans</i>	Endo- β -1,4-glucanase	ABF50848	40

*Para a EG2 de *T. Reesei*, o aminoácido 1 é o primeiro aminoácido da enzima secretada, de tal modo que os primeiros 8 aminoácidos são QQTVWGQC.

A " β -glicosidase" é definida como uma enzima da Família 3 de GH ou da Família 1 de GH que é também classificada sob EC 3.2.1.21 ou qualquer proteína, peptídeo ou fragmento destes. A β -glicosidase pode ser

de origem fúngica. Por exemplo, a β -glicosidase pode ser de uma espécie de *Trichoderma*, *Hypocrea* ou *Aspergillus*, ou a β -glicosidase pode ser de *Trichoderma reesei*.

A identidade de sequência pode ser prontamente determinada
 5 pelo alinhamento dos aminoácidos das duas sequências, ou usando alinhamento manual, ou qualquer algoritmo de alinhamento de sequências conhecidos por um versado na técnica como, por exemplo, e sem limitação, o algoritmo BLAST ((BLAST e BLAST 2.0; Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; e Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403- 410, 1990), o
 10 algoritmo revelado por Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento por homologia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), pelo método de busca por similaridade de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA
 15 em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), ou por alinhamento manual e inspeção visual (vide, por exemplo,, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., edições de 1995 suplemento)). No caso de se conduzir alinhamentos BLAST e determinações de identidade de sequências para enzimas de celulase,
 20 somente as sequências de aminoácidos que compreendem o domínio catalítico são consideradas.

Foram identificadas as razões dos componentes acessórios, a saber, EG4, Swollenin e Cip1, que exibem uma vantagem particular na realização da hidrólise de uma matéria-prima lignocelulósica. Esses conjuntos de
 25 misturas são definidos aqui pela concentração fracionária, ou seja, o peso de cada enzima acessória individual como uma função do peso total combinado de todas as enzimas acessórias presentes na mistura de enzimas de celulase. A fração de EG4 com relação à EG4, Swol e Cip1 é aqui referida por f_{EG4} , em que:

30
$$f_{EG4} = EG4/(EG4+ Swol+Cip1).$$

A fração de EG4 com relação à EG4, Swol e Cip1 é aqui referida por f_{Swol} , em que:

$$f_{swol} = Swol/(EG4+Swol+Cip1).$$

A fração de EG4 com relação à EG4, Swol e Cip1 é aqui referida por f_{Cip1} , em que:

$$f_{cip1} = Cip1/(EG4+Swol+Cip1).$$

- 5 Conforme mostrado nas figuras 4 e 5, em uma mistura de celulase que compreende celulasas primárias e enzimas acessórias, quando a fração de EG4 está entre cerca de 0,25 e cerca de 0,83 (f_{EG4}), a fração de Swol está entre cerca de 0 e cerca de 0,66 (f_{swol}) e a fração de Cip1 está entre 0 e 0,33 (f_{cip1}), níveis significativamente maiores de hidrólise foram obser-
- 10 vados em relação a uma mistura de celulase de *Trichoderma* comercial referida aqui como "Mistura de Referência". Essa mistura de enzimas acessórias cobre a Zona 1, conforme observado na figura 4. Por exemplo, a f_{EG4} pode estar entre cerca de 0,33 e cerca de 0,50, a f_{swol} pode estar entre cerca de 0,33 e cerca de 0,58 e a f_{cip1} pode estar entre cerca de 0,08 e cerca de 0,25.
- 15 Esta mistura de enzimas acessórias cobre a Zona 2, conforme observado na figura 5.

Assim, de acordo com a presente invenção, a enzima EG4 está presente em uma concentração fracionária de cerca de 0,25 a cerca de 0,83 (f_{EG4}), ou qualquer valor entre esses, por exemplo, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40,

20 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,83, ou qualquer valor entre esses. Por exemplo, a concentração fracional de EG4 (f_{EG4}) pode ser de cerca de 0,33 a cerca de 0,50, ou qualquer valor entre esses, por exemplo, 0,33, 0,34, 0,36, 0,38, 0,40, 0,42, 0,44, 0,46, 0,48, 0,50, ou qualquer valor entre esses. A enzima de Swollenin está presente em concentrações fracio-

25 nais de cerca de 0 a cerca de 0,66 (f_{swol}), ou qualquer valor entre esses, por exemplo, 0, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,66 ou qualquer valor entre esses. Por exemplo, a concentração fracionária de Swollenin (f_{swol}) pode ser de cerca de 0,33 a cerca de 0,58, ou qualquer valor entre esses, por exemplo, 0,33, 0,34, 0,36, 0,38, 0,40, 0,42,

30 0,44, 0,46, 0,48, 0,50, 0,52, 0,54, 0,56, 0,58, ou qualquer valor entre esses. A Cip1 está presente em concentrações fracionais de 0 a 0,33 (f_{cip1}), ou qualquer valor entre esses, por exemplo 0, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30,

0,33 ou qualquer valor entre esses. Por exemplo, a Cip1 pode estar em uma concentração fracionária de 0,08 a 0,25, ou qualquer valor entre esses, por exemplo, 0,08, 0,10, 0,12, 0,14, 0,16, 0,18, 0,20, 0,22, 0,24, 0,25, ou qualquer valor entre esses.

5 Os teores combinados dos componentes acessórios (EG4, Swol e Cip1) podem estar entre cerca de 5% em peso e cerca de 30% em peso ou qualquer percentual em peso entre esses, por exemplo, entre cerca de 10% em peso e cerca de 30% em peso, ou qualquer percentual em peso entre esses, e as enzimas de celulase primárias podem estar entre cerca de
10 70% em peso e cerca de 95% em peso ou qualquer percentual em peso entre esses, por exemplo entre cerca de 10% em peso e cerca de 70% em peso, ou qualquer percentual em peso entre esses, medidos em relação a ambas as enzimas de celulase primárias e acessórias na mistura enzimática. Por exemplo, os componentes acessórios podem estar presentes em cerca
15 de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou 30,5% em peso com relação ao peso combinado de todas as enzimas de celulase primárias e todas as, acessórias presentes na mistura de enzimas. As enzimas de celulase primárias podem estar presentes em cerca de 69,5, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84,
20 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 94,5 ou 95% em peso com relação ao peso combinado de todas as enzimas de celulase primárias e todas as acessórias presentes na mistura de enzimas.

A razão dos componentes de celulasas primárias, CBH1, CBH2, EG1 e EG2, um em relação ao outro pode ser ajustada conforme desejável
25 para que se alcance melhoras adicionais na hidrólise. As razões de celulasas primárias na mistura de enzimas que pode ser empregada na prática da invenção são descritas na Publicação US 2008/0057541A1. Exemplos que não devem ser considerados limitantes são fornecidos a seguir. Entretanto, deve ser entendido que a invenção não é limitada de modo nenhum pelas
30 razões específicas de celulasas primárias descritas aqui.

Por exemplo, as celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura de enzimas de celulase da presente invenção (ou seja, o teor combinado de

CBH1 e CBH2) podem estar presentes em um valor maior que ou igual a 55% em peso e menor que 85% em peso, ou qualquer percentual em peso entre esses da mistura de celulase primária composta de CBH1, CBH2, EG1 e EG2, por exemplo, CBH1 e CBH2 podem estar presente a 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85% em peso ou qualquer percentual em peso entre esses. As endoglucanases EG1 e EG2 na mistura de celulases da presente invenção podem estar presentes em valores maiores que ou iguais a 15% e menores que 45% em peso, ou qualquer percentual em peso entre esses da mistura de celulase primária composta de CBH1, CBH2, EG1 e EG2, por exemplo, EG1 e EG2 podem estar presentes a 15, 16, 18, 20, 22, 24, 25, 30, 35, 40, 45% em peso ou qualquer percentual em peso entre esses.

As enzimas de CBH1 e CBH2 podem estar, cada uma, presentes nas respectivas concentrações fracionárias de 0,25 a 0,75 em peso, ou qualquer valor entre 0,25 e 0,75 em peso, ou qualquer valor entre esses, medido em relação ao teor combinado das enzimas de CBH1 e CBH2 presentes na mistura de enzimas. Por exemplo, a CBH1 e CBH2 podem estar presentes, cada uma, em uma concentração fracionária de 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75 ou qualquer valor entre esses. As enzimas EG1 e EG2 estão, cada uma, presentes nas respectivas concentrações fracionárias de 0,35 a 0,95 (p/p) ou qualquer valor entre esses ou 0,05 a 0,65 (p/p) ou qualquer valor entre esses, medidos com relação ao conteúdo combinado de enzimas EG1 e EG2 presentes na mistura enzimática. Por exemplo, a EG1 pode estar presente em uma concentração fracionária de 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95 ou qualquer valor entre esses, e a EG2 pode estar presente em uma concentração fracionária de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, ou qualquer valor entre esses.

A mistura de enzimas de celulase da invenção é usada para a hidrólise enzimática de uma "matéria-prima lignocelulósica pré-tratada". Uma matéria-prima lignocelulósica pré-tratada é um material de origem vegetal que, antes do tratamento, contém pelo menos 20% de celulose (peso seco), por exemplo, mais que cerca de 30% de celulose, ou por exemplo mais que

40% de celulose, por exemplo 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90% ou qualquer percentual entre esses, e pelo menos 10% de lignina (peso seco), mais tipicamente pelo menos 12% (peso seco), e que foi submetida a um processo físico e/ou químico para fazer suas fibras mais acessíveis e/ou receptivas às ações das enzimas celulolíticas.

Após o pré-tratamento, a matéria-prima lignocelulósica pode conter valores mais altos de celulose. Por exemplo, se é empregado um pré-tratamento ácido, o componente de hemicelulose é hidrolisado, aumentando o nível relativo de celulose. Em uma modalidade, a matéria-prima lignocelulósica pré-tratada contém mais que cerca de 20% de celulose e mais que cerca de 10% de lignina. Nesse caso, a matéria-prima pré-tratada pode conter mais que cerca de 20% de celulose e mais que cerca de 12% de lignina.

Matérias-primas lignocelulósicas que podem ser usadas na invenção incluem, sem limitação, resíduos agrícolas como forragem de milho, palha de trigo, palha de cevada, palha de arroz, palha de aveia, palha de canola e forragem de soja; processos de resíduos de fibras como fibra de milho, polpa de beterraba, finos moídos em moinho e rejeitos ou bagaço da cana-de-açúcar; resíduos florestais como madeira de faias ou outras madeiras de lei, madeiras de coníferas e serragem; gramíneas como painço amarelo, miscanto, esparto e capim-amarelo; ou produtos de resíduos de papel pós-consumo.

As matérias-primas lignocelulósicas podem ser primeiramente submetidas à redução de tamanho por métodos que incluem, sem limitação, moagem, trituração, agitação, retalhamento, compressão/expansão ou outros tipos de ações mecânicas. A redução de tamanho por ação mecânica pode ser realizada por qualquer tipo de equipamento adaptado para tal objetivo como, por exemplo, e sem limitação, um moinho de martelo.

Exemplos não limitantes de processos de pré-tratamento incluem tratamento químico de uma matéria-prima lignocelulósica com ácido sulfúrico ou sulfuroso ou outros ácidos; amônia, cal, hidróxido de amônio ou outro álcali; etanol, butanol ou outros solventes orgânicos; ou água pressuri-

zada (vide as Patentes US 4.461.648, 5.916.780, 6.090.595, 6.043.392, 4.600.590, Weil et al. (Applied Biochemistry and Biotechnology, 68(1-2):21-40 (1997) e Öhgren, K., et al. (Applied Biochemistry and Biotechnology, 121-124:1055-1067 (2005).

5 O pré-tratamento pode ser realizado para hidrolisar a hemicelulose ou uma parte desta, que está presente na matéria-prima lignocelulósica, em açúcares monoméricos, por exemplo, xilose, arabinose, manose, galactose ou uma combinação destes. O pré-tratamento pode ser realizado de forma a quase completar a hidrólise da hemicelulose, e ocorre uma pequena
10 quantidade de conversão de celulose em glicose. Durante o pré-tratamento, tipicamente uma concentração de ácido na lama aquosa de cerca de 0,02% (p/p) a cerca de 2% (p/p), ou qualquer quantidade entre essa, é usada para o tratamento da matéria-prima lignocelulósica. O ácido pode ser, sem limitação, ácido clorídrico, ácido nítrico ou ácido sulfúrico. Por exemplo, o ácido
15 usado durante o pré-tratamento é o ácido sulfúrico.

Um método de realizar o pré-tratamento ácido da matéria-prima é por explosão de vapor usando as condições de processo descritas na Patente US 4.461.648 (Foody). Outro método para pré-tratar a mistura de matéria-prima envolve um pré-tratamento contínuo, o que significa que a matéria-prima lignocelulósica é bombeada através de um reator continuamente.
20 Pré-tratamento ácido contínuo é familiar aos versados na técnica; veja, por exemplo, a Patente US 5.536.325 (Brink); WO 2006/128304 (Foody e Tolan); e a Patente US 4.237.226 (Grethlein). Técnicas adicionais conhecidas pelos versados na técnica podem ser usadas conforme requerido, tal como o processo descrito na Patente US 4.556.430 (Converse et al.)
25

Conforme mostrado acima, o pré-tratamento pode ser conduzido com um álcali. Contrastando com o pré-tratamento ácido, o pré-tratamento com um álcali não hidrolisa o componente de hemicelulose da matéria-prima, o álcali reage com os grupos ácidos presentes na hemicelulose de modo a abrir a superfície do substrato. A adição do álcali pode também alterar a estrutura cristalina da celulose, de modo que esta se torne mais suscetível à hidrólise. Exemplos de álcalis que podem ser usados em pré-
30

tratamentos incluem amônia, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio e hidróxido de sódio. Preferivelmente, o pré-tratamento não é conduzido com um álcali insolúvel em água, como cal ou hidróxido de magnésio.

Um exemplo de um pré-tratamento com álcali adequado é Explosão de Congelamento com Amônia, Explosão de Fibras com Amônia, e Expansão de Fibras com Amônia (processo "AFEX"). De acordo com esse processo, a matéria-prima lignocelulósica é contatada com amônia ou hidróxido de amônio em um vaso de pressão por tempo suficiente para permitir que a amônia ou o hidróxido de amônio altere a estrutura cristalina das fibras de celulose. A pressão é então rapidamente reduzida, o que permite que a amônia flameje ou ferva e exploda a estrutura da fibra de celulose. (vide as Patentes US 5.171.592, 5.037.663, 4.600.590, 6.106.888, 4.356.196, 5.939.544, 6.176.176, 5.037.663 e 5.171.592). A amônia flamejante pode ser então recuperada através de processos conhecidos.

A matéria-prima lignocelulósica pode ser processada após o pré-tratamento, mas antes da hidrólise enzimática por qualquer de diversas etapas, tal como diluição com água, lavagem com água, tamponamento, filtração ou centrifugação, ou por uma combinação destes processos, antes da hidrólise enzimática, como é de conhecimento dos versados na técnica.

A matéria-prima lignocelulósica pré-tratada é, a seguir, submetida à hidrólise enzimática. Pelo termo "hidrólise enzimática", quer-se dizer um processo pelo qual enzimas de celulase agem na celulose para converter toda ou uma parte desta em açúcares solúveis. Açúcares solúveis devem incluir oligômeros e monômeros de hexose solúveis em água de até seis unidades de monômeros que são derivados da parte celulósica da matéria-prima lignocelulósica pré-tratada. Exemplos de açúcares solúveis incluem, sem limitação, glicose, celobiose, celodextrinas ou misturas destes. Os açúcares solúveis podem ser predominantemente celobiose e glicose. Os açúcares solúveis podem ser predominantemente glicose.

O processo de hidrólise enzimática pode converter de cerca de 80% a cerca de 100% da celulose em açúcares solúveis, ou qualquer faixa entre essa. Por exemplo, o processo de hidrólise enzimática pode converter

de cerca de 90% a cerca de 100% da celulose em açúcares solúveis, ou qualquer faixa entre essa. Por exemplo, o processo de hidrólise enzimática pode converter de cerca de 98% a cerca de 100% da celulose em açúcares solúveis, ou qualquer faixa entre essa.

- 5 A hidrólise enzimática usando a mistura de celulase pode ser hidrólise em bateladas, hidrólise contínua ou uma combinação destas. A hidrólise pode ser agitada, não misturada ou uma combinação destas.

A hidrólise enzimática pode ser realizada a uma temperatura de cerca de 45°C a cerca de 75°C, ou qualquer temperatura entre essas como, por exemplo, uma temperatura de 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75°C ou qualquer temperatura entre essas, e um pH de cerca de 3,5 a cerca de 7,5 ou qualquer pH entre esses como, por exemplo, um pH de 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ou qualquer pH entre esses. A concentração inicial de celulose no reator de hidrólise, antes do início da hidrólise pode ser de cerca de 4% (p/p) a cerca de 15% (p/p), ou qualquer quantidade entre essas, por exemplo 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15% ou qualquer quantidade entre essas. A dosagem combinada de todas as enzimas de celulase primárias pode ser de cerca de 1 a cerca de 100 mg de proteína por grama de celulose, ou qualquer quantidade entre essas, por exemplo, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg de proteína por grama de celulose ou qualquer quantidade entre essas. A hidrólise pode ser realizada por um período de tempo de cerca de 12 horas a cerca de 200 horas, ou qualquer período entre esses, a hidrólise pode ser realizada, por exemplo, por um período de 15 a 100 horas, ou qualquer período entre esses, ou pode ser realizada por 12, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 120, 140, 160, 180, 200 ou qualquer combinação de horas entre essas. Deve ser entendido que as condições reacionais não devem limitar a invenção de qualquer maneira e podem ser ajustadas conforme desejável pelos versados na técnica.

- 30 A hidrólise enzimática é tipicamente realizada em um reator de hidrólise. A mistura de enzimas é adicionada à matéria-prima lignocelulósica pré-tratada (também referida como "substrato") antes, durante ou depois da

adição do substrato ao reator de hidrólise.

A mistura de enzimas pode ser produzida em uma ou mais fermentações de cultura líquida submersa e pode ser separada das células ao final da fermentação por filtração, centrifugação, ou outro processo conhecido por um versado na técnica. A fração que contém celulase isenta de células pode então ser concentrada (via ultrafiltração, por exemplo), conservada e/ou estabilizada antes do uso. Alternativamente, as misturas de enzimas de celulase não são separadas das células, e sim adicionadas à hidrólise enzimática com as células.

A mistura de celulase pode ser uma solução aquosa de proteína em água, uma *mistura de proteínas em água, um grânulo ou pó sólido ou um gel. A mistura que compreende enzimas de celulase pode incluir aditivos tais como tampões, detergentes, estabilizadores, cargas ou outros aditivos conhecidos pelos versados na técnica.

A mistura de enzimas da invenção pode ser derivada de qualquer uma de diversas fontes. As sequências que codificam as enzimas da mistura de enzimas de celulase podem ser de *Ascomycetina* ou *Basidiomycetina*. Por exemplo, as sequências de codificação são de um gênero selecionado do grupo que consiste em *Trichoderma ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Hypocrea ssp.*, *Humicola ssp.*, *Neurospora ssp.*, *Orpinomyces ssp.*, *Gibberella ssp.*, *Emericella ssp.*, *Chaetomiun ssp.*, *Fusarium ssp.*, *Penicillium ssp.*, *Magnaporthe ssp.*, e *Phanerochaete ssp.* Por exemplo, as sequências que codificam as celulasas primárias e *ok p22/13 enzimas acessórias são de *Trichoderma reesei*.

As celulasas primárias e as enzimas acessórias da invenção podem ser clonadas e expressas em qualquer micro-organismo adequado conhecido pelos versados na técnica tal como um hospedeiro de expressão, tal como uma bactéria ou um fungo. O micro-organismo pode ser um fungo. O construto genético pode ser introduzido no micróbio hospedeiro por qualquer um dos diversos métodos conhecidos pelos versados na técnica da transformação microbiana incluindo, sem limitação, tratamento das células com CaCl_2 , eletroforação, bombardeio biolítico, fusão mediada por PEG de proto-

plastos (por exemplo, a Patente US 6.939.704).

Todas as enzimas na mistura de enzimas de celulase podem ser secretadas de uma cepa de um organismo, referido aqui por uma "mistura completa" de enzimas secretadas. Pelo termo "mistura completa", entende-se que todas as proteínas são secretadas de modo extracelular no meio de cultura por um micro-organismo específico. Em uma modalidade da invenção, as enzimas primárias e acessórias constituem de cerca de 70 a cerca de 100% em peso das enzimas secretadas na mistura, ou qualquer quantidade entre essas como, por exemplo, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100% ou qualquer quantidade entre essas. A mistura de enzimas pode ser parte de um sistema de celulases secretadas que inclui β -glicosidase. A mistura de enzimas pode incluir a mistura completa de enzimas secretadas por *Trichoderma reesei*.

Alternativamente, a mistura de enzimas pode ser expressa individualmente ou em subgrupos de diferentes cepas de diferentes organismos, e as enzimas combinadas de modo a formar a mistura de enzimas de celulase. Também se contempla que a mistura de enzimas pode ser expressa individualmente ou em subgrupos de diferentes cepas de um único organismo, tais como de diferentes cepas de *Trichoderma reesei* e as enzimas combinadas de modo a formar a mistura de enzimas de celulase. Por exemplo, todas as enzimas podem ser expressas a partir de uma única cepa de *Trichoderma reesei*.

A mistura de enzimas de celulase pode ser expressa a partir de sequências de codificação fúngicas. Nessa modalidade, as sequências de codificação seriam de qualquer fonte fungíca. Os termos "fungo", "fungos", "Ascomycotina", "Basidiomycotina" e termos relacionados (por exemplo, "ascomycete" e "basidiomycete") devem incluir organismos como os definidos em *The Fungi: An Advanced Treatise* (GC Ainsworth, FK Sparrow, AS Sussman, eds.; Academic Press 1973).

A concentração de enzimas acessórias em relação às enzimas de celulase primárias na mistura de enzimas pode ser ajustada por deleção de uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam as enzimas

de celulase primárias ou outras enzimas secretadas na célula hospedeira de acordo com técnicas conhecidas. A deleção de uma sequência de ácidos nucleicos pode ser conseguida pela construção de um construto que inclui sequências da própria sequência de ácidos nucleicos alvo na construção, mas em uma forma alterada. Após a transformação da construção no hospedeiro de expressão, a recombinação então ocorre com a sequência de ácidos nucleicos alvo alterada resultando na inserção da sequência alterada para quebrar a sequência de ácidos nucleicos nativa. Com sua sequência interrompida, o gene alterado, na maioria dos casos, será traduzido em uma proteína não funcional, ou simplesmente não será traduzido. Um exemplo de um método que pode ser usado para deletar uma sequência de ácidos nucleicos alvo de uma célula hospedeira inclui, sem limitação, os métodos descritos na patente US 5.298.405.

A concentração de enzimas acessórias com relação às enzimas de celulase primárias na mistura de enzimas também pode ser ajustada pela adição de uma ou mais enzimas desejáveis à mistura de celulase que é produzida por uma célula hospedeira, incluindo uma célula hospedeira que foi modificada para resultar na quebra de um ou mais ácidos nucleicos que codificam enzimas de celulase primárias, conforme mostrado acima, e pela determinação da concentração de cada enzima na mistura final de enzimas de celulase.

A razão dos componentes acessórios um em relação ao outro em uma mistura de enzimas de celulase pode ser ajustada na mistura de enzimas por modificação genética de um hospedeiro de expressão. Por exemplo, o hospedeiro de expressão pode ser geneticamente modificado para ajustar a expressão de uma ou mais enzimas acessórias e, opcionalmente, das enzimas de celulase primárias, conforme exigido pela introdução de um construto de expressão que codifica uma enzima acessória de acordo com técnicas recombinantes conhecidas. Por exemplo, isso pode ser conseguido pela introdução de cópias múltiplas de um construto que contém uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a enzima acessória a ser expressa. Um plasmídeo que compreende o construto de expressão pode conter se-

quências que permitem que esse se recombine com sequências no genoma do hospedeiro de expressão, de modo que se integre ao genoma do hospedeiro de expressão. Múltiplas cópias da sequência de ácidos nucleicos que codifica a enzima acessória a ser expressa podem ser integradas ao gene

5 do organismo hospedeiro para aumentar os níveis de expressão do gene. Alternativamente, o plasmídeo pode permanecer no hospedeiro em uma forma não integrada, em tal caso, ele replica de maneira independente do genoma do hospedeiro. Em outra modalidade, as celulasas primárias, as enzimas acessórias ou uma combinação destas pode também ser superex-

10 pressas pela introdução de um promotor à montante da sequência de ácidos nucleicos nativa alvo que aumenta o nível de expressão da sequência nativa a níveis acima dos níveis endógenos.

Os níveis de expressão das enzimas acessórias e das enzimas de celulase primárias podem também ser modulados pelo ajuste do pH da

15 fermentação. Em uma modalidade da invenção, a mistura de enzimas de celulase é produzida pela condução de uma fermentação a um pH de cerca de 2 a cerca de 5 de modo a ajustar a expressão das enzimas de celulase primárias e das enzimas acessórias. Por exemplo, o pH da fermentação pode ser de cerca de 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0, 4,2, 4,4,

20 4,6, 4,8, 5,0 ou qualquer valor de pH entre esses.

Os açúcares solúveis produzidos pela hidrólise enzimática podem ser fermentados por micróbios. Os produtos da fermentação podem incluir quaisquer produtos desejáveis que agreguem valor ao vegetal de fermentação. Exemplos de produtos de fermentação são etanol, butanol e ácido

25 láctico. Para a produção de etanol, a fermentação pode ser realizada por um ou mais micróbios que são capazes de fermentar açúcares em etanol. Por exemplo, a fermentação pode ser realizada por levedura de *Saccharomyces* recombinante que foi modificada de modo a fermentar glicose, manose, galactose e xilose em etanol, ou glicose, galactose, xilose e arabinose

30 em etanol. Leveduras recombinantes que podem fermentar a xilose em etanol são descritas na Patente US 5.789.210. A levedura produz um caldo de fermentação que compreende o etanol em uma solução aquosa. Para a pro-

dução de ácido láctico, a fermentação pode ser realizada por um micróbio que fermenta açúcares em ácido láctico.

As misturas de enzimas da invenção são de uma composição diferente do que as enzimas de ocorrência natural para a hidrólise da celulose e daquelas descritas na técnica. A f_{EG4} , f_{Swol} e f_{Cip1} de uma mistura de enzimas nativas secretada por *Trichoderma reesei* são 0,26, 0,20 e 0,54, respectivamente, e assim estão fora da Zona 1 e Zona 2 nas figuras 4 e 5, respectivamente. As misturas enzimáticas nas modalidades da presente invenção podem ter uma atividade pelo menos 12% maior que a mistura de enzimas nativas secretadas por *Trichoderma reesei*.

EXEMPLOS

A presente invenção será adicionalmente ilustrada nos seguintes exemplos

Exemplo 1: Purificação das celulasas primárias, CBH1, CBH2, EG1 e EG2, e componentes acessórios, EG4, Swol e Cip1, de celulase de *Trichoderma reesei*.

Uma cepa de *Trichoderma reesei* foi cultivada em fermentação líquida submersa sob condições que induzem a produção de celulase conforme é do conhecimento dos versados na técnica. (Vide, por exemplo, White et al., Patente US 6.015.703). A mistura bruta de proteína de *Trichoderma* foi secretada pelas células no caldo de fermentação. As células fúngicas foram removidas do caldo de fermentação por filtração em um filtro de microfibra de vidro que continha um leito de filtro Harborlite. As celulasas primárias (CBH1, CBH2, EG1, EG2) foram separadas do filtrado bruto por cromatografia de troca iônica, conforme descrito por Bhikhabhai et al. (Journal of Applied Biochemistry, 6:336-345 (1984)). Essa etapa isola EG1 e EG2. As CBH1 e CBH2 foram então adicionalmente purificadas por cromatografia por afinidade com *p*-aminofenil-1-tio- β -D-celobiosídeo conforme relatado por Piyachomkwan et al. (Carbohydrate Research, 303:255-259 (1997, 1998) e Analytical Biochemistry, 255:223-235 (1998)). De modo a purificar os componentes acessórios, uma celulase sem CBH1, CBH2 e EG1 foi primeiramente separada por cromatografia por troca aniônica. Um volume de leite empaco-

tado de 75 mL de DEAE-Sefarose foi equilibrado em 10 mM de Tris, 10 mM de Bis-Tris, pH 8.5. O material de partida foi ajustado para essas condições e aplicado à coluna a 5 mL/min. A coluna foi então lavada com 600 mL de 10 mM de Tris, 10 mM de Bis-Tris, pH 7,5 e, então, 300 mL de 10 mM de Tris, 10 mM de Bis-Tris, pH 6.5. As proteínas ligadas foram então eluídas com 900 mL de um gradiente 0-150 mM de NaCl. Isso resultou na eluição de dois picos principais no perfil de absorbância de UV. O primeiro continha exclusivamente EG4, enquanto o segundo continha Swol e Cip1. As frações associadas ao segundo pico foram juntadas, concentradas e separadas por cromatografia por filtração em gel usando uma coluna de BioGel P-60. Isso rendeu uma preparação pura de Cip1 e Swol parcialmente purificada. Frações contendo Swol foram tratadas com 1,8 M de sulfato de amônio para precipitar seletivamente Swol. O pélete deste tratamento foi separado por cromatografia por filtração em gel conforme descrito anteriormente. Isso resultou em uma forma substancialmente pura de Swol. Os componentes purificados foram concentrados e trocados por tampão em 50 mM de citrato de sódio, pH 5,0, usando uma célula de ultrafiltração agitada (Amicon) e uma membrana NMWL de polietersulfona de 10 kDa.

Exemplo 2: Medindo a concentração e pureza das celulasas primárias e componentes acessórios.

As concentrações de proteína foram quimicamente determinadas usando o método de Bradford et al. (Analytical Biochemistry, 72:248-254, (1976)). Amostras de cada proteína purificada (6 µg) foram separadas por SDS-PAGE e visualizadas pós-eletroforicamente com o corante de Azul de Coomassie. A intensidade da coloração de cada banda foi intensificada por densitometria de exploração usando um sistema de imagens Chemigenius2 (Syngene). Uma amostra de celulase de *Trichoderma* (12 µg de proteína total) foi incluída para referência. A pureza relativa dos componentes acessórios e primários foi calculada pela divisão da intensidade da banda para cada componente pela intensidade de coloração total medida para todas as bandas na mesma faixa do gel. EG2 sem um módulo de ligação a carboidratos estava presente em pequenas quantidades, mas não foi considerada

uma contaminante nessa preparação. A pureza relativa da CBH1 e CBH2 foi maior que 95%, enquanto a da EG1, EG2, EG4, Swol e Cip1 foi maior que 90%.

Para melhor demonstrar que cada preparação de componentes não continha celulasas contaminantes, CBH1, CBH2, EG1, EG2, EG4, Swol e Cip1 purificadas foram analisadas por Western blotting usando antissoro policlonal específico a componentes de coelhos (Figura 2). As proteínas foram separadas por 10% de SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) a 100 V por uma hora usando uma célula Mini Trans-Blot® da BioRad. Western blotting foi feito usando o método de Birkett et al. (FEBS Letters, 187(2): 211-218, (1985)). O antissoro policlonal específico para componentes foi gerado usando peptídeos sintéticos, cujas sequências foram baseadas na sequência de aminoácidos primários de CBH1, CBH2, EG1, EG2, EG4, Swol e Cip1 de *Trichoderma reesei*, conforme é do conhecimento dos versados na técnica.

Exemplo 3: Determinação das concentrações de celulasas primárias e enzimas acessórias em uma celulase de *Trichoderma reesei* comercial.

As concentrações relativas dos componentes primários e acessórios em uma celulase de *Trichoderma reesei* comercial foram determinadas por ELISA.

A celulase e padrões de componentes purificados foram diluídos em 1-100 µg/mL em uma solução tamponada de fosfato, pH 7,2 (PBS) e incubado durante a noite a 4°C em placas de microtitulação (Costar EIA – alta ligação). Essas placas foram lavadas com PBS contendo 0,1% de Tween 20 (PBS/Tween), e então incubadas em PBS contendo 1% de albumina do soro bovino (PBS/BSA) por 1 hora à temperatura ambiente. Fontes de microtitulação bloqueadas foram lavadas com PBS/Tween. Antissoros de coelho específicos para CBH1, CBH2, EG1, EG2, EG4, Swol e Cip1 foram diluídos em PBS/BSA, adicionados a placas de microtitulação separadas e incubados por duas horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com anticorpos anticoelho de cabra acoplados à horseradish peroxidase

por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, tetrametilbenzidina foi adicionada a cada placa e incubada por 1 hora à temperatura ambiente.

A absorvância em 360 nm foi medida em cada fonte e convertida em concentração proteica usando os padrões de CBH1, CBH2, EG1, EG2, EG4, Swol e Cip1 desenvolvidos no Exemplo 2. A concentração relativa de cada componente foi calculada pela divisão dessas concentrações de proteína pela concentração total de CBH1, CBH2, EG1, EG2, EG4, Swol e Cip1.

A composição da celulase de *Trichoderma* comercial é mostrada na tabela 8.

10 Tabela 8: Composição de uma celulase de *Trichoderma* comercialização

Componente	Concentração (% de Celulase)	Componentes Primários (% de PC)	f_{EG4}	F_{Swol}	F_{Cip1}
CBH1	47,1	82,7	0,324	0,190	0,486
CBH2	24,0				
EG1	5,8				
EG2	5,8				
EG4	5,6				
Swol	3,3				
Cip1	8,4				

O percentual total de proteína de celulase contabilizado pelas celulases primárias (%PC) foi 82,7%, em que:

$$\%PC = \frac{\%CBH1 + \%CBH2 + \%EG1 + \%EG2}{\%CBH1 + \%CBH2 + \%EG1 + \%EG2 + \%EG4 + \%Swol + \%Cip1}$$

15 EG4, Swol e Cip1 contabilizaram 5,6%, 3,3% e 8,4% da proteína de celulase total.

A concentração fracionária de EG4 com relação a todos os componentes acessórios (f_{EG4}) é $5,6\% / (5,6\% + 3,3\% + 8,4\%) = 0,324$.

A concentração fracionária de Swol com relação a todos os componentes acessórios (f_{Swol}) é $3,3\% / (5,6\% + 3,3\% + 8,4\%) = 0,190$.

20 A concentração fracionária de Cip1 com relação a todos os componentes acessórios (f_{Cip1}) é $8,4\% / (5,6\% + 3,3\% + 8,4\%) = 0,486$.

Essa composição de componentes acessórios está mapeada no

gráfico ternário mostrado na figura 3 e é rotulada como "mistura de referência".

A concentração de CBHs com relação a todo o conjunto de celulas primárias, %CBH, é 57% (47,1%/82,7%) CBH1 + 29% (24,0%/82,7%)

5 CBH2 = 86%, em que:

$$\%CBH = \frac{\%CBH1 + \%CBH2}{\%CBH1 + \%CBH2 + \%EG1 + \%EG2}$$

A concentração de CBH2 com relação a toda CBH (f_{c2}) é 29%/(57%+29%) = 0,337.

A concentração de EGs com relação a todo o conjunto de celulas primárias é 14%. A concentração de EG2 com relação a toda (EG1+EG2) EG primária (f_{E2}) é 7%/(7%+7%) = 0,500.

Exemplo 4: Medição da atividade de hidrólise da celulose de misturas de celulase em uma matéria-prima lingocelulósica pré-tratada.

Misturas de EG4, Swol e Cip1 foram preparadas de acordo com as razões mostradas na Tabela 9. Essas misturas de componentes acessórios foram usadas para complementar um controle de componentes primários que é uma mistura de CBH1, CBH2, EG1 e EG2. A composição da mistura de celulas primárias era 32% de CBH1, 47% de CBH2, 17% de EG1 e 4% de EG2. Esta é a mistura otimizada de celulas primárias identificadas pelos métodos descritos no pedido US 2008/0057541 A1. A complementação foi feita de tal modo que a mistura de componentes acessórios contabilizasse 18% (% de AC) das proteínas totais, enquanto o %PC = 82%. Essas misturas de celulas primárias e acessórios foram testadas em um ensaio de hidrólise de celulose misturada de 0,25 mL. As misturas de celulase foram diluídas em um tampão de citrato contendo 0,5% de benzoato de sódio, complementado com uma preparação de β -glicosidase de *Aspergillus niger* e incubado com palha de trigo pré-tratada com ácido. O pré-tratamento foi realizado de acordo com Foody, Patente US 4.461.648. A incubação foi a 50°C por 24 horas e o nível de conversão de celulose alvo foi maior que 70%. A atividade enzimática foi calculada pela determinação da quantidade de en-

zimas exigidas para atingir o nível alvo de conversão de celulose. Essas atividades foram normalizadas para a atividade da mistura de celulases primárias testada na ausência de celulases acessórias (%PC = 100%). A massa total de proteína testada em todos esses ensaios foi a mesma. Erros padrão

5 das medidas da atividade das celulases foram calculados usando uma abordagem de comparação de modelos (Motulsky, H., e A. Christopoulos (2004) *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. Oxford University Press, Inc., Nova Iorque. 351 pp.). Um teste T foi usado para comparar a atividade de cada mistura de

10 componentes acessórios com o controle de celulases primárias, a mistura de referência e a mistura ótima. Valores P menores que ou iguais a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Uma média pesada através do espaço da mistura ternária foi aplicada para aperfeiçoar os dados de atividade. Os dados de atividade normalizados para um ponto de dado foi tirada a média com seus seis pontos

15 vicinais mais próximos. O ponto em questão foi dado um w de pesagem = 1,00 e os seis pontos vicinais foram, cada um, dada pesagem de $w = 0,15$ na fórmula seguinte para a média pesada (X_w): $X_w = \sum w_i x_i / \sum w_i$, onde o subscrito i denota uma variável contável para somar sobre todos os 7 pontos

20 descritos acima e x_i e w_i indicam a atividade normalizada e pesagem do i^o ponto, respectivamente.

A atividade da hidrólise associada a cada mistura de componentes acessórios é mostrada na Tabela 9 e plotada com uma função de suas f_{EG4} , f_{Swol} e f_{Cip1} na figura 3.

Tabela 9: Atividade relativa de uma mistura de celulase primária complementada com misturas de células acessórias de diferentes f_{EG4} , f_{Swol} e f_{Cip1} .

Mistura	f_{EG4}^a	f_{Swol}^b	f_{Cip1}^c	Atividade Relativa	CI95 (95% de intervalo de Confidência)	Δ Mistura de Enzima Acessória Ótima ^d Valor P	Controle de Δ PC Valor P	Δ Mistura de Referência Valor P
Controle de PC	-	-	-	1,00	0,96 – 1,04	<0,001	1,000	<0,001
Mistura de Referência	0,324	0,190	0,486	1,16	1,12 – 1,21	<0,001	<0,001	1,000
1	1,000	-	-	1,14	1,12 – 1,117	<0,001	<0,001	0,504
2	0,834	0,083	0,083	0,083	1,22 – 1,34	0,059	<0,001	0,002
3	0,667	0,167	0,166	0,166	1,22 – 1,33	0,094	<0,001	0,001
4	0,500	0,250	0,250	0,250	1,18 – 1,32	0,009	<0,001	0,055
5	0,334	0,333	0,333	0,333	1,17 – 1,28	0,007	<0,001	0,087
6	0,167	0,417	0,416	0,416	1,14 – 1,20	<0,001	<0,001	0,519
7	-	0,500	0,500	0,500	1,03 – 1,10	<0,001	0,017	0,001
8	-	1,000	-	-	1,02 – 1,10	<0,001	0,005	0,036
9	0,083	0,834	0,083	0,083	1,15 – 1,18	<0,001	<0,001	0,075
10	0,167	0,666	0,167	0,167	1,18 – 1,26	0,002	<0,001	0,094
11	0,250	0,500	0,250	0,250	1,15 – 1,32	0,003	<0,001	0,588
12	0,417	0,167	0,416	0,416	1,16 – 1,28	0,011	<0,001	0,040
13	0,500	-	0,500	0,500	1,15 – 1,27	0,003	<0,001	0,167
14	-	-	1,00	1,02	0,97 – 1,07	<0,001	0,489	<0,001
15	0,083	0,083	0,834	1,02	0,99 – 1,06	<0,001	0,100	<0,001
16	0,167	0,167	0,666	1,04	0,97 – 1,10	<0,001	0,347	0,003
17	0,250	0,250	0,500	1,14	1,11 – 1,16	<0,001	<0,001	0,315
18	0,417	0,416	0,167	1,36	1,26 – 1,46	1,000	<0,001	<0,001
19	0,500	0,500	-	1,26	1,21 – 1,30	0,023	<0,001	0,008
20	0,833	0,167	-	1,25	1,21 – 1,29	0,013	<0,001	0,003
21	0,667	0,333	-	1,24	1,18 – 1,29	0,011	<0,001	0,046
22	0,333	0,667	-	1,24	1,18 – 1,30	0,013	<0,001	0,045
23	0,1678	0,833	-	1,21	1,14 – 1,28	0,004	<0,001	0,248

Continuação

24	-	0,833	0,167	1,03	0,98 – 1,08	<0,001	0,345	<0,001
25	-	0,667	0,333	1,08	1,05 – 1,12	<0,001	0,003	0,007
26	-	0,333	0,667	1,04	1,00 – 1,07	<0,001	0,183	<0,001
27	-	0,167	0,833	1,04	0,96 – 1,13	<0,001	0,373	0,022
28	0,167	-	0,833	1,06	1,01 – 1,12	<0,001	0,068	0,006
29	0,333	-	0,667	1,11	1,04 – 1,19	<0,001	0,014	0,228
30	0,667	-	0,333	1,23	1,18 – 1,27	0,005	<0,001	0,055
31	0,833	-	0,167	1,29	1,25 – 1,33	0,068	<0,001	<0,001
32	0,750	0,167	0,083	1,28	1,23 – 1,34	0,099	<0,001	0,001
33	0,667	0,250	0,083	1,24	1,21 – 1,26	0,002	<0,001	0,012
34	0,584	0,333	0,083	1,27	1,22 – 1,32	0,003	<0,001	0,098
35	0,500	0,417	0,083	1,33	1,26 – 1,41	0,400	<0,001	<0,001
36	0,459	0,458	0,083	1,33	1,24 – 1,42	0,281	<0,001	0,002
37	0,417	0,500	0,083	1,30	1,23 – 1,37	0,026	<0,001	0,054
38	0,333	0,584	0,083	1,32	1,27 – 1,38	0,374	<0,001	<0,001
39	0,250	0,667	0,083	1,28	1,22 – 1,34	0,163	<0,001	<0,001
40	0,167	0,750	0,083	1,19	1,17 – 1,22	<0,001	<0,001	0,613
41	0,750	0,083	0,167	1,28	1,24 – 1,32	0,070	<0,001	<0,001
42	0,583	0,250	0,167	1,26	1,21 – 1,32	0,016	<0,001	0,026
43	0,500	0,333	0,167	1,34	1,25 – 1,43	0,860	<0,001	<0,001
44	0,333	0,500	0,167	1,34	1,26 – 1,43	0,572	<0,001	<0,001
45	0,250	0,583	0,167	1,29	1,25 – 1,34	0,089	<0,001	<0,001
46	0,083	0,750	0,167	1,15	1,13 – 1,18	<0,001	<0,001	0,402
47	0,667	0,083	0,250	1,25	1,21 – 1,28	0,002	<0,001	0,061
48	0,583	0,167	0,250	1,27	1,21 – 1,34	0,144	<0,001	0,001
49	0,417	0,333	0,250	1,30	1,20 – 1,40	0,194	<0,001	0,021
50	0,375	0,375	0,250	1,33	1,24 – 1,42	0,545	<0,001	0,001
51	0,333	0,417	0,250	1,31	1,23 – 1,40	0,315	<0,001	0,002
52	0,167	0,583	0,250	1,20	1,17 – 1,22	0,001	<0,001	0,085

Continuação

53	0,083	0,667	0,250	1,17	1,14 – 1,21	<0,001	<0,001	0,936
54	0,584	0,083	0,333	1,25	1,19 – 1,31	0,038	<0,001	0,007
55	0,500	0,167	0,333	1,25	1,19 – 1,32	0,034	<0,001	0,018
56	0,417	0,250	0,333	1,24	1,19 – 1,30	0,005	<0,001	0,086
57	0,250	0,417	0,333	1,24	1,20 – 1,29	0,039	<0,001	0,001
58	0,167	0,500	0,333	1,19	1,15 – 1,24	0,001	<0,001	0,284
59	0,083	0,584	0,333	1,16	1,14 – 1,19	<0,001	<0,001	0,618
60	0,500	0,083	0,417	1,21	1,15 – 1,28	0,003	<0,001	0,343
61	0,333	0,250	0,417	1,19	1,14 – 1,25	0,001	<0,001	0,369
62	0,291	0,292	0,417	1,17	1,14 – 1,19	<0,001	<0,001	0,824
63	0,250	0,333	0,417	1,17	1,09 – 1,29	0,002	<0,001	0,816
64	0,083	0,500	0,417	1,10	1,08 – 1,12	<0,001	0,004	0,001
65	0,417	0,083	0,500	1,21	1,15 – 1,27	0,003	<0,001	0,201
66	0,333	0,167	0,500	1,16	1,12 – 1,21	<0,001	<0,001	1,000
67	0,167	0,333	0,500	1,14	1,09 – 1,19	0,001	<0,001	0,411
68	0,083	0,417	0,500	1,07	1,05 – 1,10	<0,001	0,221	<0,001
69	0,333	0,083	0,584	1,17	1,11 – 1,23	0,003	<0,001	0,200
70	0,250	0,167	0,583	1,13	1,09 – 1,16	<0,001	<0,001	0,405
71	0,208	0,209	0,583	1,11	1,07 – 1,16	<0,001	<0,001	0,558
72	0,167	0,250	0,583	1,06	1,04 – 1,08	<0,001	0,177	<0,001
73	0,083	0,333	0,584	1,04	1,00 – 1,07	<0,001	0,831	<0,001
74	0,250	0,083	0,667	1,10	1,06 – 1,14	<0,001	0,004	0,021
75	0,083	0,250	0,667	1,03	1,00 – 1,07	<0,001	0,024	0,001
76	0,167	0,083	0,750	1,03	0,99 – 1,06	<0,001	0,186	<0,001
77	0,083	0,167	0,750	1,02	0,98 – 1,06	<0,001	0,006	<0,001

a_fEG4 = %EG4/(%EG4+%Swol+%Cip1)b_fSwol = %Swol/(%EG4+%Swol+%Cip1)c_fCip1 = %Cip1/(%EG4+%Swol+%Cip1)

d Mistura 18 conforme coluna 1

A adição de EG4 (1,14) sozinha resultou em um aperfeiçoamento significativo na atividade de hidrólise de celulose ($P < 0,001$, Tabela 8) em comparação com a mistura de celulase primária (1,00). A adição de Swol (1,06) sozinha resultou em um aperfeiçoamento mais modesto, porém significativo ($P = 0,005$) na atividade da hidrólise de celulose, em comparação com a mistura de celulase primária. Contudo, nem a adição de EDG nem Swol sozinha resultou em atividade maior que a Mistura de Referência (1,16). A adição de Cip1 por si mesmo (1,02) não aumentou significativamente a atividade da hidrólise de celulose da mistura de enzimas, em comparação com o controle de celulase primária.

O efeito da adição combinada de Cip1 e Swol em atividade de hidrólise de celulose foi mínimo. Uma mistura contendo quantidades iguais de Cip1 e Swol (1,07) tinha uma atividade similar àquela de Swol sozinha (1,060, mas foi maior que Cip1 sozinha (1,02).

A combinação de quantidades iguais de Swol e EG4 (1,260) aperfeiçoou significativamente a atividade da mistura de celulase ($P = 0,008$) em comparação com a Mistura de Referência (1,16). A adição combinada de quantidades equivalentes de EG4 e Cip1 (1,21) aperfeiçoou o desempenho da hidrólise em comparação com a Mistura de Referência, mas isso chegou ao limite da significância estatística. Sem desejar estar ligado a qualquer teoria, EG4 pode agir em comum acordo tanto com Swol como com Cip1 para potencializar a atividade da hidrólise de celulose de uma mistura de celulase primária.

Os resultados da adição de componentes acessórios comuns e todas as misturas binárias foram modelados usando-se a Equação 1 para inicialmente determinar os parâmetros de sinergia, α , β , γ , e então calcular a composição de componentes acessórios, ótima, modelo. Esses resultados estão mostrados na Tabela 10.

Equação 1:

$$A_T = f_{PC}A_{PC} + f_{EG4}A_{EG4} + f_{Swol}A_{Swol} + f_{Cip1}A_{Cip1} + \alpha\sqrt{f_{EG4}A_{EG4} \cdot f_{Swol}A_{Swol}} + \beta\sqrt{f_{EG4}A_{EG4} \cdot f_{Cip1}A_{Cip1}} + \gamma\sqrt{f_{Swol}A_{Swol} \cdot f_{Cip1}A_{Cip1}}$$

A_T é a atividade de hidrólise de celulose total da mistura de en-

zimas;

f_{PC} é a percentagem total de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 na mistura de enzimas;

A_{PC} é a atividade da mistura de componentes primários sozinha;

5 f_{EG4} é a concentração fracionária de EG4;

A_{EG4} é a atividade associada à adição de EG4 a uma mistura de celulasas primárias em ausência de Swol e Cip1;

f_{Swol} é a concentração fracionária de Swol;

10 A_{Swol} é a atividade associada à adição de Swol a uma mistura de celulasas primárias em ausência de EG4 e Cip1;

f_{Cip1} é a concentração fracionária de Cip1;

A_{Cip1} é a atividade associada à adição de Cip1 a uma mistura de celulasas primárias em ausência de EG4 e Swol;

α representa o sinergismo entre EG4 e Swol;

15 β representa o sinergismo entre EG4 e Cip1;

γ representa o sinergismo entre Swol e Cip1.

Tabela 10: Determinação das razões ótimas modelo dos componentes acessórios

α (EG4-Swol)	β (EG4-Cip1)	γ (Swol-Cip1)	Ótimo Modelo		
			f_{EG4}	f_{Swol}	f_{Cip1}
1,14	1,02	0,29	0,564	0,314	0,122

20 O ótimo modelo consiste em $f_{EG4}=0,564$, $f_{Swol}=0,314$ e $f_{Cip1}=0,122$ e é rotulado como a "Mistura Ótima Modelo" na figura 3. Essa composição diferiu substancialmente daquela da celulase de *Trichoderma* comercial (Mistura de Referências) analisada no Exemplo 3.

Ao se testar o espaço de mistura ternária de componentes acessórios, a atividade da hidrólise de celulose ótima era de 1,36 e foi associada a uma $f_{EG4}=0,417$, $f_{Swol}=0,416$ e $f_{Cip1}=0,167$.

Ambas as misturas de enzimas ótimas modelo e empíricas continham altas concentrações de EG4 e Swol em comparação com concentrações menores de Cip1. Em contraste, a f_{Cip1} na celulase de *Trichoderma*

comercial (Mistura de Referência) era de 0,486, substancialmente maior que ambas as ótimas modelo (0,122) e empíricas. A atividade da hidrólise de celulose associada a esta Mistura de Referência, $f_{EG4}=0,324$, $f_{Swol}=0,190$ e $f_{Cip1}=0,486$ era 1,16, significativamente menor ($P<0,001$) que a ótima empírica (1,36). Outras misturas testadas no espaço de mistura de componentes acessórios com uma $f_{Cip1}>0,333$ tinham também uma atividade significamente menor que a mistura ótima empírica e não foram significativamente melhores que a mistura ótima empírica e não foram significativamente melhores que a Mistura de Referência.

Isso demonstra que a atividade de uma celulase de *Trichoderma* comercial em um substrato lignocelulósico pré-tratado pode ser aperfeiçoada mediante ajuste das razões dos componentes acessórios, EG4, Swol e Cip1. Os componentes acessórios quando adicionados individualmente a uma mistura de celulases primárias tinham atividade mais baixa que a Mistura de Referência. Isso grifa a necessidade de se focar em componentes acessórios múltiplos juntos que agem sinergisticamente com uma mistura de celulases. Ao se trocar as razões de componentes acessórios daquelas presentes nas razões de celulase de *Trichoderma* comercial para as razões ótimas determinadas aqui, os inventores aperfeiçoaram a taxa de hidrólise de lignocelulose de 17,2%.

A figura 4 é uma plotagem ternária modificada da figura 3. Nesse gráfico, somente misturas de componentes acessórios que variam de atividade entre 1,23 e 1,36 são mostradas, enquanto as misturas de componentes com atividade menor que 1,23 tenham sido removidas. Essas misturas de enzimas têm atividade substancialmente maior que a Mistura de Referência. A posição da Mistura de Referência é mostrada, a título de referência, apesar de ter uma atividade menor que 1,23. O espaço de mistura que representa as misturas de componentes acessórios mostradas nessa figura é referido como Zona 1 e representa misturas de enzimas com atividade maior que a Mistura de Referência.

A figura 5 é uma plotagem ternária modificada da figura 4. Nesse gráfico, somente misturas de componentes acessórios que variam de ati-

dade entre 1,30 e 1,36 são mostradas, enquanto as misturas de componentes acessórios com atividade menor que 1,30 foram removidas. A posição da Mistura de Referência é novamente mostrada a título de referência. O espaço de mistura que representa as misturas de componentes acessórios mostradas nesta figura é referido como Zona 2 e representa misturas de enzimas com atividade ainda mais aumentada em comparação com a Mistura de Referência.

A mistura ótima de componentes acessórios consiste em $f_{EG4}=0,417$, $f_{Swol}=0,416$ e $f_{Cip1}=0,167$.

10 Exemplo 5: Comparação de Misturas de Componentes que Variam em Percentagem das Celulases Primárias Totais e Acessórias

Foi então testada a atividade de hidrólise de várias misturas de celulases contendo componentes primários e acessórios que variam na percentagem de componentes primários totais (% de PC). A composição intrínseca da mistura de celulase primária foi fixada, 32% de CBH1, 47% de CBH2, 17% de EG1 e 4% de EG2. A composição intrínseca da mistura de componentes acessórios foi também fixada, 41% de EG4, 42% de Swol e 16% de Cip1. Essas duas misturas foram combinadas em diferente % de PC e testadas em palha de trigo pré-tratada conforme de outro modo descrito no Exemplo 4. Os resultados desses ensaios são mostrados na figura 6.

A % de PC da celulase de *Trichoderma* é rotulada aqui como "Razão de Referência" e foi de 82,7%. Uma % de PC de cerca de 90% resultou na mais alta atividade de hidrólise de celulose. Isso foi ligeiramente aperfeiçoado em comparação com a Razão de Referência. A hidrólise de celulose diminuiu rapidamente uma vez que a % de PC era maior que cerca de 90%. Esses resultados demonstram também que a % de PC pode ser diminuída substancialmente daquela presente na celulase de *Trichoderma* comercial, para aproximadamente 75%, sem alterações acentuadas da atividade da hidrólise de celulose. Aumento da composição de componentes acessórios combinados em uma celulase de *Trichoderma* comercial pode provar ser benéfica para a hidrólise de outras matérias-primas lignocelulósicas e aquelas derivadas de condições de pré-tratamento diferentes. Isso poderia

resultar de alterações, sem estar ligado à teoria, no grau de polimerização, cristalinidade e/ou teores residuais de hemicelulose ou lignina em comparação com o substrato pré-tratado usado aqui.

Exemplo 6: Medição da atividade de hidrólise de mistura de celulas primárias e acessórias em matéria-prima lignocelulósica pré-tratada em um período de tempo prolongado.

Uma mistura de componentes acessórios com nossos valores de Referência para valores de f_{EG4} , f_{Swol} e f_{Cip1} do Exemplo 3 foi comparada a uma mistura aperfeiçoada de componentes acessórios com cerca de 17% de aperfeiçoamento de atividade, conforme descrição no Exemplo 4, em ensaios de hidrólise de celulose de longo curso. A mistura aperfeiçoada continha a seguinte composição: $f_{EG4}=0,417$, $f_{Swol}=0,416$ e $f_{Cip1}=0,167$. Ambas as misturas de componentes acessórios foram adicionadas a uma mistura de celulas primárias, que consistia em 32% de CBH1, 47% de CBH2, 17% de EG1 e 4% de EG2. Uma mistura das celulas primárias foi testada individualmente, sem a adição de componentes acessórios, para comparação. Essas três misturas foram dosadas em 6 mg de enzima por grama de celulose e ainda suplementadas com uma preparação de β -glicosidase de *Aspergillus niger* em 100 UI/g de celulose.

As misturas foram incubadas com 25 g/L de celulose em citrato 50 mM, pH 5,0, contendo 0,1% de benzoato de sódio a 50°C, por 194 horas, com agitação orbital contínua. Alíquotas de 0,7 mL foram retiradas em vários pontos de tempo e a concentração de glicose na porção solúvel foi ensaiada e convertida em uma medida de conversão de celulose fracionária. Os dados de conversão foram então ajustados com uma hipérbole retangular com um prazo linear adicional usando-se a minimização da soma de resíduos quadrados de ajuste. A equação tinha a seguinte forma = $(\text{max} \cdot \text{tempo}) / (\text{meio-máximo} + \text{tempo}) + c \cdot \text{tempo}$. Ambos os conjuntos de dados se encaixam globalmente em valores máximos e meio-máximos e um valor compartilhado da variável c . Esse experimento foi repetido conforme descrito em três ocasiões.

Os resultados de um experimento representativo são mostrados

na figura 7. Essa figura demonstra que o grau de conversão de celulose em cada ponto de tempo era maior para a mistura de componentes acessórios, ótima, em comparação com a Mistura de Referência. Os resultados dos três experimentos replicados foram ainda analisados calculando-se o tempo re-

5 querido para uma conversão de celulose alvo de 0,75. Esses resultados são mostrados na Tabela 11. Misturas de enzimas contendo a mistura ótima de componentes acessórios requereram somente 38 horas, enquanto as misturas de enzimas contendo a Mistura de Referência de componentes acessórios requereram 54 horas para atingir este alvo. Isso correspondeu a uma

10 economia de tempo de 30% e foi estatisticamente significativa ($P < 0,001$, Teste de Student T).

Tabela 11: Tempos requeridos para que as misturas de enzimas atingissem uma conversão de substrato alvo de 0,75

	Tempo para Atingir o Alvo de Conversão de Substrato =0,75 (h)	Valor de P (Relativo a PC + Mistura de Referência)
Mistura de PC	108 $\pm$ 4 (n=3)	-
PC + Mistura de Referência	54 $\pm$ 5 (n=3)	-
PC + Mistura Ótima	38 $\pm$ 5 (n=3)	<0,001

Exemplo 7: Produção de mistura de celulasas por culturas de *T. reesei* em pH 5,0 e pH 3,5.

15

A cepa de *T. reesei* P59G foi desenvolvida em Batata Dextrose Ágar a 28-30°C até um revestimento confluyente de esporo ser obtido. Os esporos foram coletados e usados para inocular 750 mL de meio de Berkeley (10 g/L de glicose, 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 g/L de KH_2PO_4 , 0,31 g/L de

20 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,53 g/L de CaCl_2 ; 5,1 g/L de macerado de milho seco, 5 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,7 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em frasco defletor de 2L. Depois de 3 dias de crescimento a 28°C e 150 rpm, essa cultura foi usada para inocular 10 L de meio de fermentação com a seguinte composição inicial: 13 g/L de glicose, 2,2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,39 g/L

25 de KH_2PO_4 , 0,7 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,185 g/L de CaCl_2 , 6 g/L de macerado de milho seco, 3,75 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,05 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Uma fermentação aeróbica, alimentada em bateladas,

usando um coquetel indutor de celulase (compreendendo como uma função de carboidrato total, 56% de gentiobiase, 14% de soforose, 6% de celobiose, 10% de trealose, 6% de maltotriose, 4% de glicose e 14% de outros carboidratos) foi operada por 6 dia, e 28-30°C, em um fermentador New Brunswick

5 Microferm, em pH 5,0 ou pH 3,5. Depois de 6 dias, a cultura é filtrada em Harborlite e o filtrado de cultura ajustado para pH 4,5 e conservada com 0,5% de benzoato para prevenir o crescimento microbiano.

Todas as citações são aqui incorporadas a título de referência.

A presente invenção foi descrita com respeito a uma ou mais

10 modalidades. Contudo, ficará aparente para aqueles versados na técnica que inúmeras variações e modificações podem ser feitas sem se desviar do escopo da invenção conforme definido nas reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a conversão de uma matéria-prima lignocelulósica pré-tratada em açúcares solúveis, caracterizado pelo fato de que compreende hidrolisar enzimaticamente a matéria-prima lignocelulósica pré-tratada com uma mistura de enzimas de celulase, mistura de enzima celulase
5 essa que compreende:

uma enzima acessória EG4 presente em uma concentração fracionária (f_{EG4}) de 0,33 a 0,50 (p/p),

uma enzima acessória Swollenin presente em uma concentração
10 fracionária (f_{Swol}) de 0,33 a 0,58 (p/p), e

uma enzima acessória Cip1 presente em uma concentração fracionária (f_{Cip1}) de 0,08 a 0,25 (p/p),

em que cada concentração fracionária é medida com relação a todas as enzimas acessórias EG4, Swollenin e Cip1 presentes na mistura de
15 enzimas de celulase,

em que a mistura de enzimas de celulase compreende as enzimas de celulase primárias CBH1, CBH2, EG1 e EG2,

em que as enzimas de celulase primárias possuem um teor combinado na mistura de enzimas de celulase de 70 a 95% em peso, e em que
20 as enzimas EG4, Swollenin e Cip1 possuem um teor combinado na mistura de enzimas de celulases de 5 a 30% em peso, sendo que tais percentuais em peso são medidos com relação às enzimas de celulase primárias e enzimas EG4, Swollenin e Cip1 acessórias presentes na mistura de enzimas de celulase.

25 2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o teor combinado das enzimas celulase primárias na mistura de enzimas celulase é de 70 a 90% em peso, e em que o teor combinado das enzimas celulase acessórias na mistura de enzimas celulase é de 10 a 30% em peso, sendo que tais percentuais em peso são medidos com relação às
30 enzimas celulase primárias e enzimas acessórias presentes na mistura de enzimas celulase.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que as enzimas celulase primárias e as enzimas acessórias possuem um teor combinado na mistura de enzimas celulase de 70 a 100% em peso, medido com relação à proteína total presente na mistura de enzimas celulase.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
5 fato de que as enzimas CBH1 e CBH2 possuem um teor combinado de 55 a 85% em peso e as enzimas EG1 e EG2 possuem um teor combinado de 15 a 45% em peso, medidos com relação às enzimas CBH1, CBH2, EG1 e EG2 presentes na mistura de enzimas celulase.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo
10 fato de que as enzimas CBH1 e CBH2 estão, cada uma, presentes em uma concentração fracionária de 0,25 a 0,75 (p/p), medidas com relação ao teor combinado das enzimas CBH1 e CBH2 presentes na mistura de enzimas celulase.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo
15 fato de que a enzima EG1 está presente em uma concentração fracionária de 0,35 a 0,95 (p/p), e em que a enzima EG2 está presente em uma concentração fracionária de 0,05 a 0,65 (p/p), medidas com relação ao teor combinado das enzimas EG1 e EG2 presentes na mistura de enzimas celulase.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
20 fato de que a enzima acessória de EG4 está presente em uma concentração fracionária (f_{EG4}) de 0,33 a 0,50 (p/p), medida com relação a todas as enzimas acessórias EG4, Swollenin e Cip1 presentes na mistura de enzimas celulase.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
25 fato de que a enzima acessória de Swollenin está presente em uma concentração fracionária (f_{Swol}) de 0,20 a 0,66 (p/p), medida com relação a todas as enzimas acessórias EG4, Swollenin e Cip1 presentes na mistura de enzimas celulase.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
30 fato de que a enzima acessória de Swollenin está presente em uma concentração fracionária (f_{Swol}) de 0,33 a 0,58 (p/p), medida com relação a todas as enzimas acessórias EG4, Swollenin e Cip1 presentes na mistura de enzimas celulase.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a Cip1 está presente em uma concentração fracionária (f_{Cip1}) de 0,08 a 0,25 (p/p), medida com relação a todas as enzimas acessórias EG4, Swollenin e Cip1 presentes na mistura de enzimas celulase.

5 11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as enzimas celulase primárias e as enzimas acessórias são de origem fúngica.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a fonte fúngica é um fungo *Ascomycete* ou *Basidiomycete*.

10 13. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a fonte fúngica é selecionada do grupo que consiste em *Trichoderma ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Hypocrea ssp.*, *Humicola ssp.*, *Neurospora ssp.*, *Orpinomyces ssp.*, *Gibberella ssp.*, *Emericella ssp.*, *Chaetomium ssp.*, *Fusarium ssp.*, *Penicillium ssp.*, *Magnaporthe ssp.*, e *Phanerochaete ssp.*

15 14. Processo, de acordo com a reivindicação 13, em que a fonte fúngica é *Trichoderma reesei*.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as enzimas celulase primárias e as enzimas acessórias são obtidas de um organismo pela expressão das sequências codificadoras que são endógenas ao organismo.

20 16. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as enzimas celulase primárias e as enzimas acessórias são obtidas de um organismo pela expressão das sequências codificadoras que são heterólogas ao organismo.

25 17. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as enzimas celulase primárias e as enzimas acessórias são produzidas por expressão em *Trichoderma reesei*.

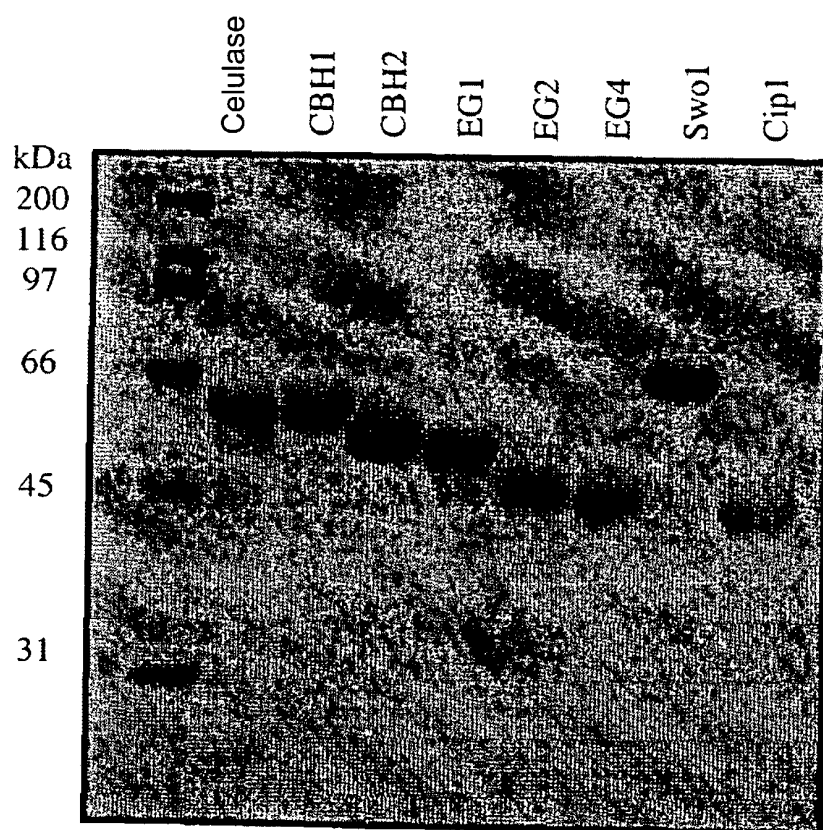
18. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa de hidrolisar enzimaticamente, pelo menos 80% em peso de celulose na matéria-prima lignocelulósica pré-tratada é convertida em açúcares solúveis.

19. Processo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado

pelo fato de que a etapa de hidrolisar enzimaticamente é seguida por uma etapa de fermentação para produzir etanol, ácido láctico, butanol ou uma combinação destes a partir dos açúcares solúveis.

20. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
- 5 fato de que a mistura de enzimas celulase é uma mistura completa de enzimas secretadas de uma fonte microbial, sendo que as enzimas celulase primárias e as enzimas acessórias constituem 70 e 100% em peso das enzimas secretadas na mistura, e em que as enzimas secretadas compreendem enzimas não celulase adicionais que constituem entre 0 e 30% em peso das enzimas
- 10 secretadas na mistura.

21. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a mistura de enzimas celulase compreende β -glicosidase.

**Fig. 1**

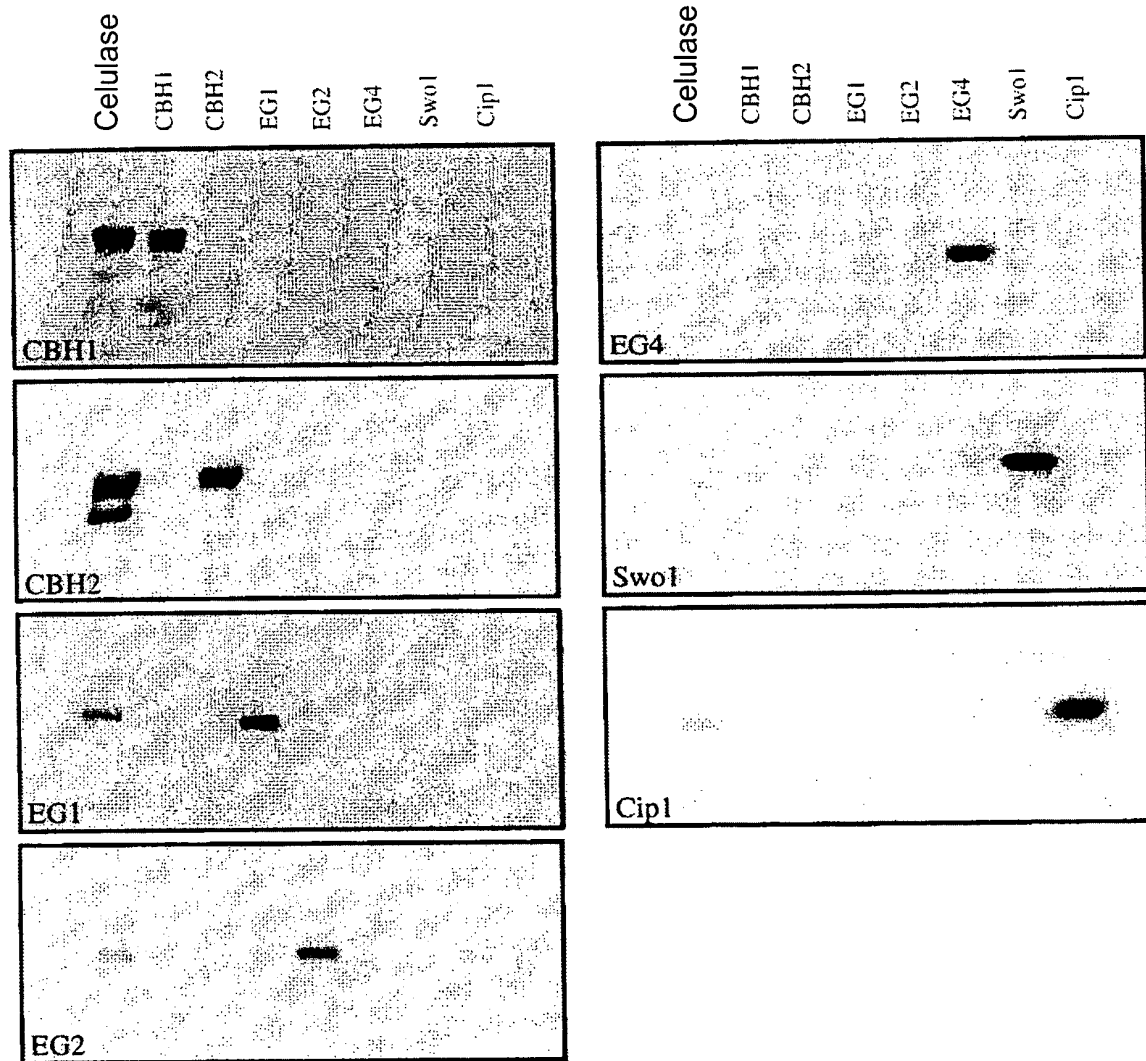


Fig. 2

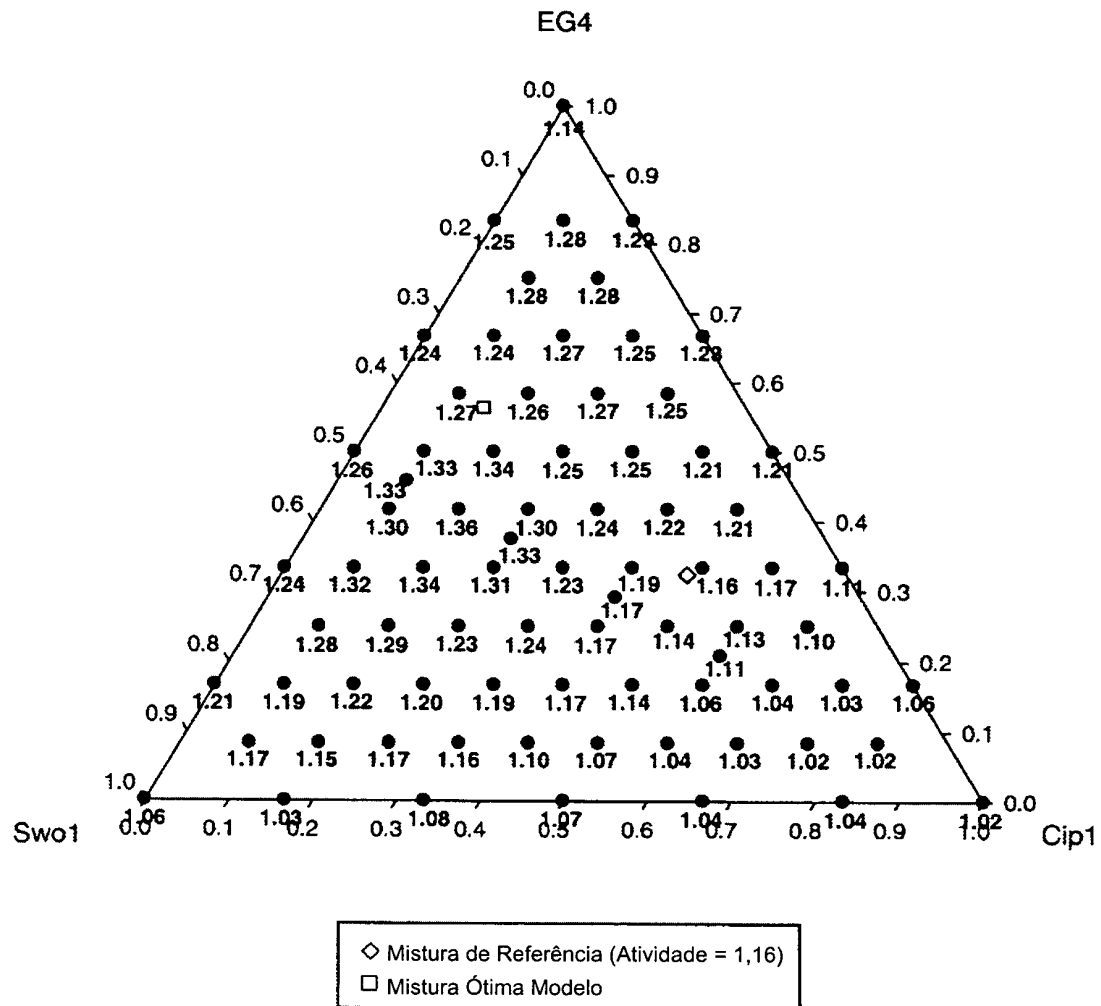
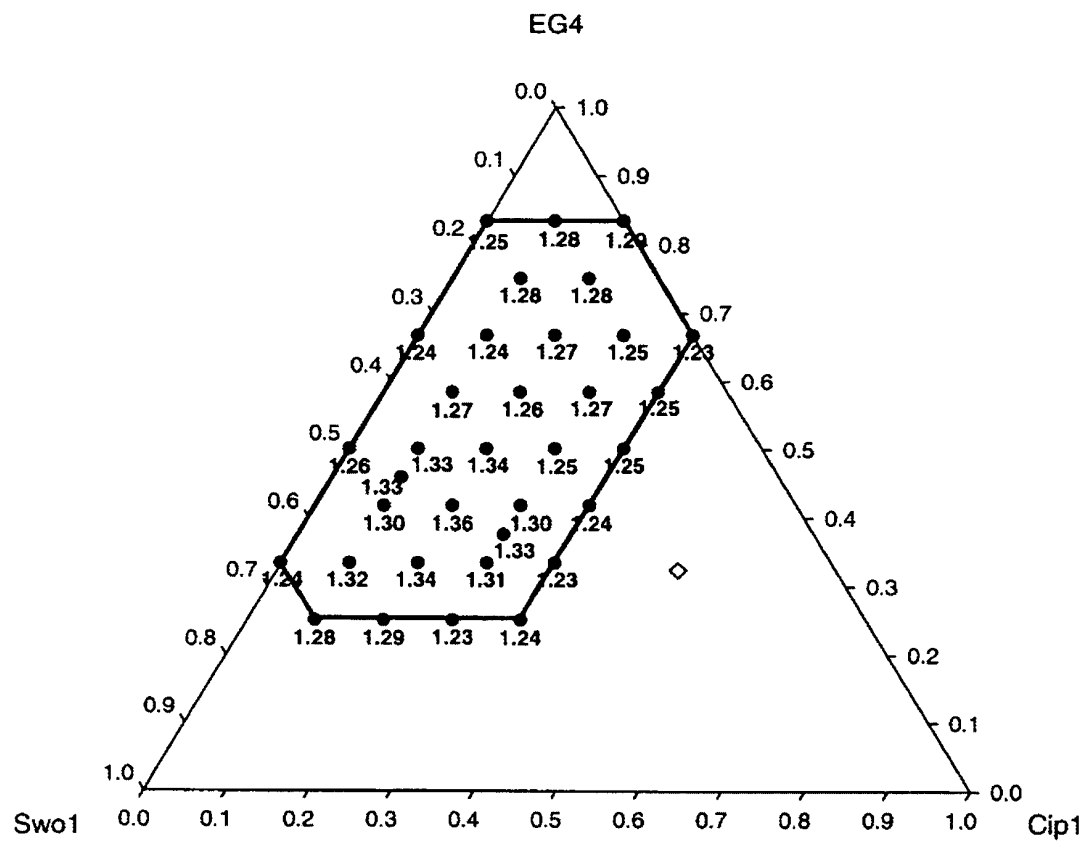


Fig. 3



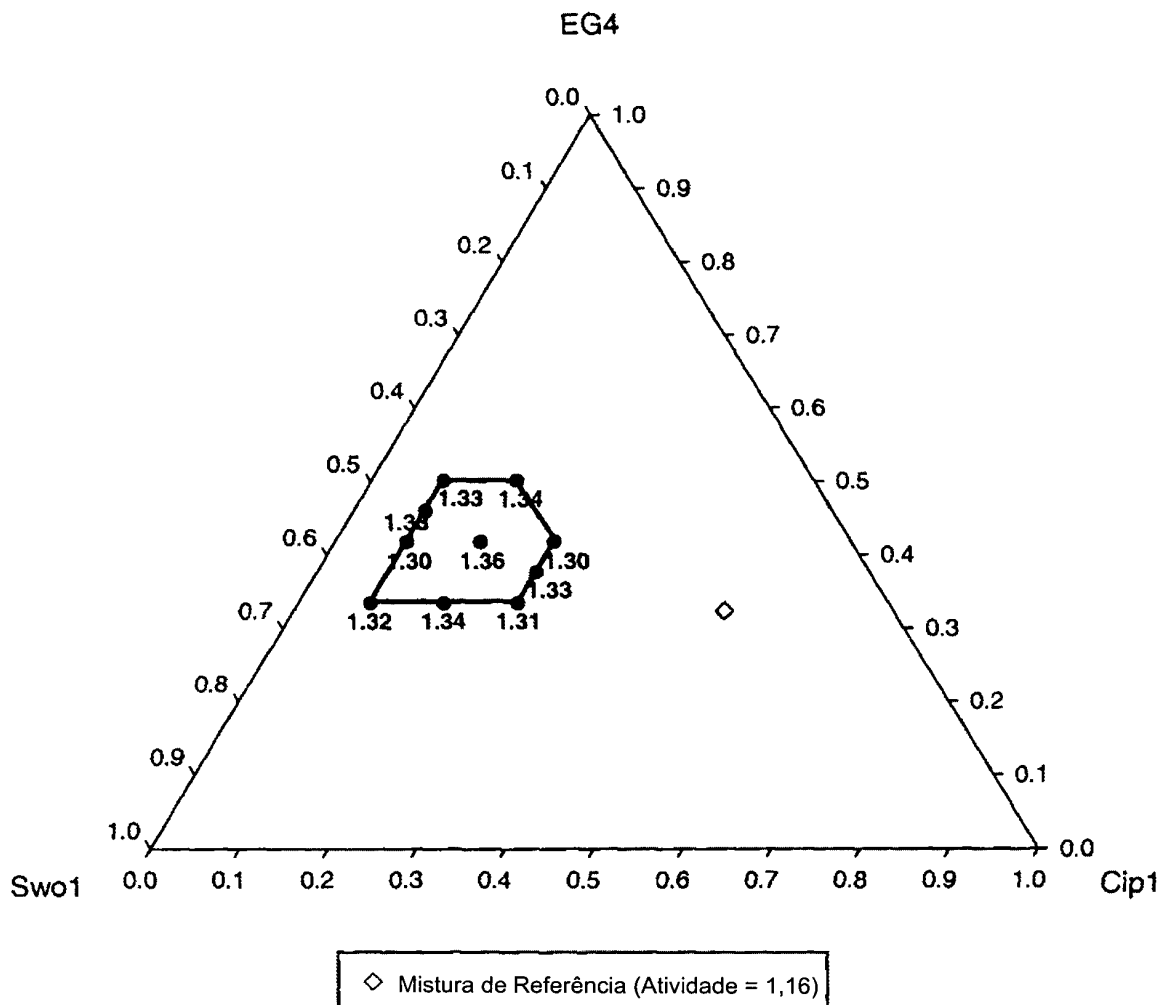
Zona 1

$$0.25 \leq f_{EG4} \leq 0.83$$

$$0.00 \leq f_{Swo1} \leq 0.66$$

$$0.00 \leq f_{Cip1} \leq 0.33$$

Fig. 4



Zona 2

$$0.33 \leq f_{EG4} \leq 0.50$$

$$0.33 \leq f_{Swo1} \leq 0.58$$

$$0.08 \leq f_{Cip1} \leq 0.25$$

Fig. 5

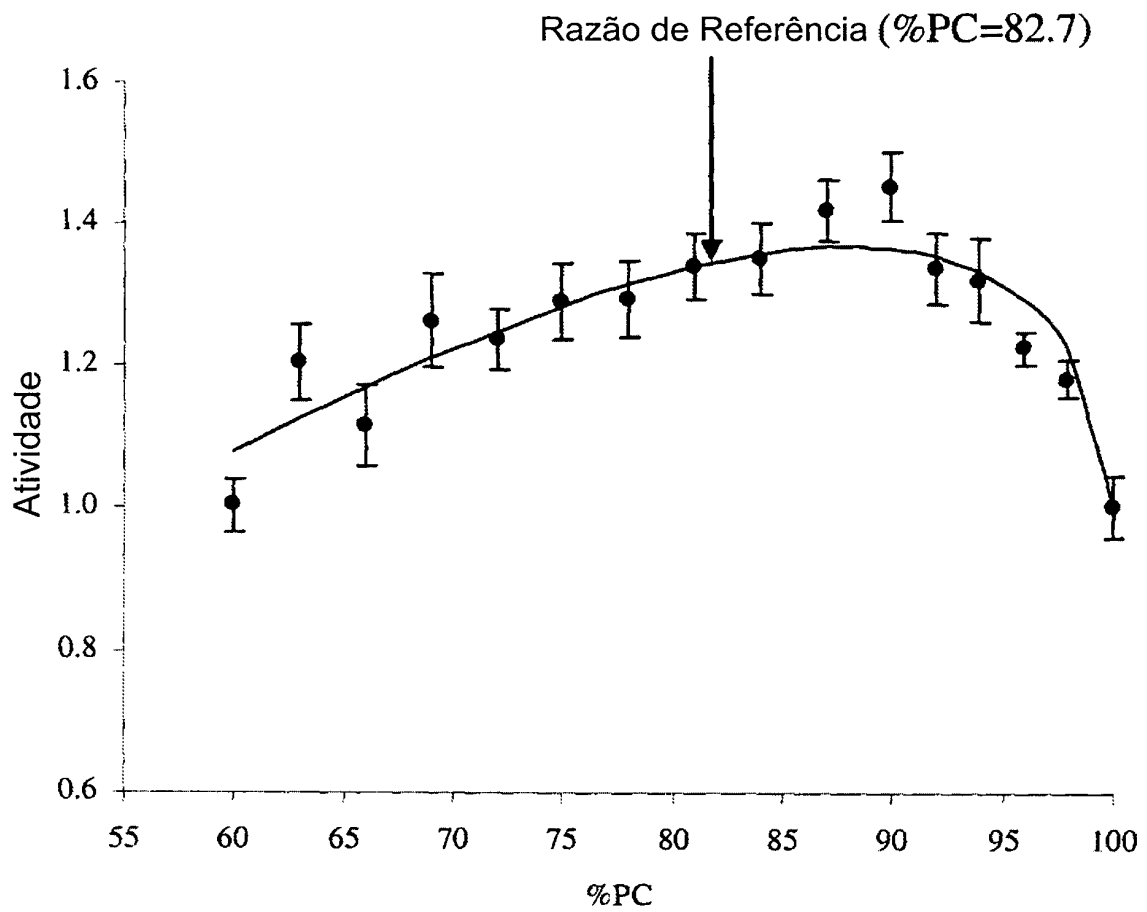
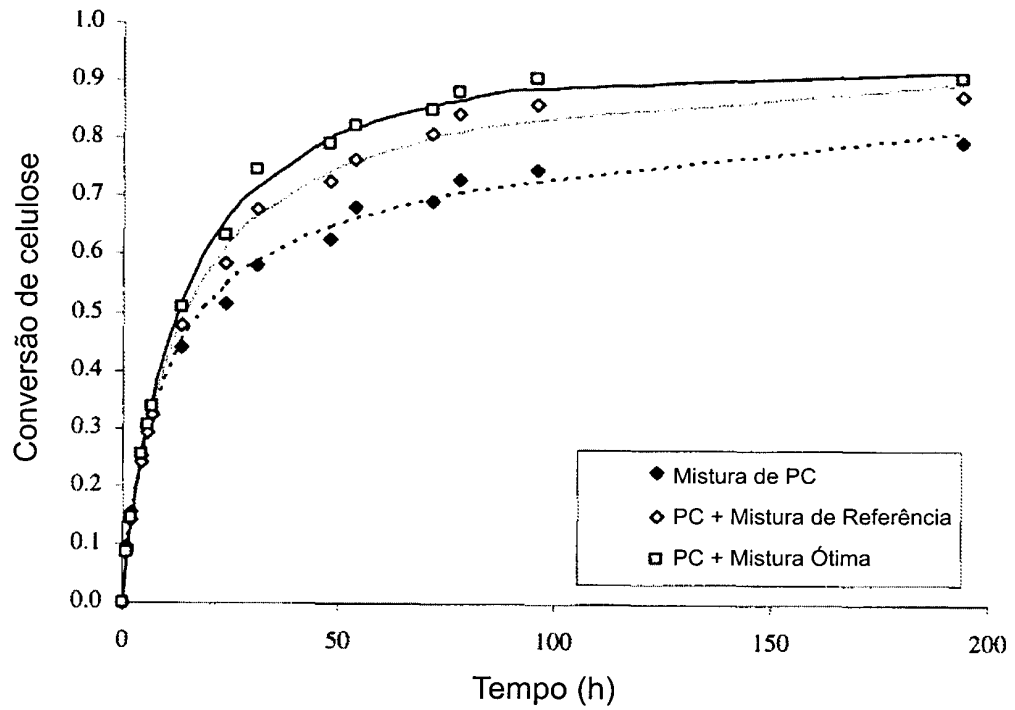
**Fig. 6**

Fig. 7A**Fig. 7B**