

(11) Número de Publicação: **PT 2082054 E**

(51) Classificação Internacional:
C12P 19/02 (2011.01) **C12P 19/12** (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2007.11.13**

(30) Prioridade(s): **2006.11.13 US 858579 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.07.29**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.05.16**
149/2012

(73) Titular(es):

DANISCO US INC.
925 PAGE MILL ROAD PALO ALTO,
CALIFORNIA 94304 US

(72) Inventor(es):

BRADLEY KELEMEN US
EDMUND A. LARENAS US
COLIN MITCHINSON US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA MELHORAR O RENDIMENTO DE PROCESSOS DE CONVERSÃO DE CELULOSE**

(57) Resumo:

OS PRESENTES ENSINAMENTOS PROPORCIONAM MÉTODOS PARA CONVERSÃO DE MATERIAIS CELULÓSICOS EM AÇÚCARES SOLÚVEIS. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS MÉTODOS PARA AUMENTAR O RENDIMENTO DE GLUCOSE A PARTIR DA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE MATERIAIS CELULÓSICOS. OS PRESENTES ENSINAMENTOS PROPORCIONAM ADICIONALMENTE MÉTODOS PARA AUMENTAR O RENDIMENTO DE CELOBIOSE A PARTIR DA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE MATERIAIS CELULÓSICOS.

RESUMO

"Método para melhorar o rendimento de processos de conversão de celulose"

Os presentes ensinamentos proporcionam métodos para conversão de materiais celulósicos em açúcares solúveis. São também proporcionados métodos para aumentar o rendimento de glucose a partir da sacarificação enzimática de materiais celulósicos. Os presentes ensinamentos proporcionam adicionalmente métodos para aumentar o rendimento de celobiose a partir da sacarificação enzimática de materiais celulósicos.

FIG.1(A)

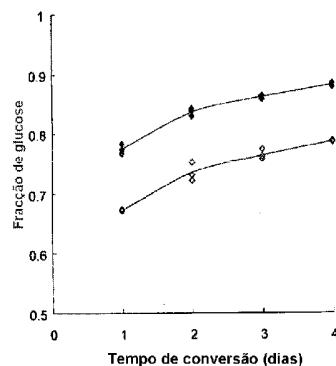
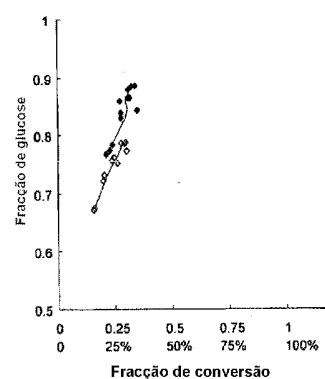


FIG. 1(B)



DESCRIÇÃO

"Método para melhorar o rendimento de processos de conversão de celulose"

3. CAMPO

O presente ensinamento refere-se a métodos para melhorar o rendimento de açúcares desejáveis na conversão enzimática de materiais celulósicos.

4. ANTECEDENTES

A produção de açúcares a partir de materiais celulósicos é conhecida desde há algum tempo, bem como a fermentação e destilação subsequentes destes açúcares em etanol. Muito do desenvolvimento anterior ocorreu na altura de 2.^a Guerra Mundial quando os combustíveis eram particularmente caros em países tais como Alemanha, Japão e União Soviética. Estes processos iniciais eram principalmente dirigidos a hidrólise ácida mas eram bastante complexos na sua engenharia e concepção e eram muito sensíveis a pequenas variações em variáveis de processo, tais como temperatura, pressão e concentrações de ácido. Uma discussão exaustiva destes processos iniciais é apresentada em "Production of Sugars From Wood Using High-Pressure Hydrogen Chloride", Biotechnology and Bioengineering, Volume XXV, a 2757-2773 (1983).

A oferta abundante de petróleo no período desde a 2.^a Guerra Mundial até ao início dos anos 70 abrandou a investigação sobre a conversão de etanol. Contudo, devido à crise do petróleo de 1973, os investigadores intensificaram os seus esforços para desenvolver processos para a utilização de madeira e de subprodutos agrícolas para a produção de etanol como uma fonte de energia alternativa. Esta investigação foi especialmente importante para desenvolvimento de etanol como um aditivo de gasolina para reduzir a dependência dos Estados Unidos da América da produção de petróleo estrangeira, para aumentar o índice de octanas de combustíveis e para reduzir os poluentes de escape como uma medida ambiental.

Concorrentemente com a "crise do petróleo", como ficou conhecida, a Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América promulgou regulamentos requerendo a redução de aditivos de chumbo, num esforço para reduzir a poluição do ar. Na medida em que o etanol é virtualmente uma substituição do chumbo, algumas refinarias têm seleccionado etanol como o substituto, especialmente dado que este pode ser facilmente introduzido numa operação de refinaria sem investimento de capital em equipamento dispendioso.

Para além de melhorar os processos de sacarificação em fase gasosa a alta pressão e a alta temperatura desenvolvidos há décadas, a investigação actual é dirigida principalmente a processos de conversão enzimática. Estes processos utilizam enzimas a partir de uma variedade de organismos, tais como fungos mesófilos e termófilos, leveduras e bactérias, que degradam a celulose em açúcares fermentáveis. Subsiste ainda incerteza sobre estes processos e sobre a sua capacidade para serem escalonados para comercialização, bem como no que se refere às suas taxas ineficientes de produção de etanol.

Celulose e hemicelulose estão entre os materiais vegetais mais abundantes produzidos por fotossíntese. Estes podem ser degradados para utilização como uma fonte de energia por numerosos microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, que produzem enzimas extracelulares capazes de hidrolisar substratos poliméricos em açúcares monoméricos (Aro *et al.*, 2001). Os organismos são muitas vezes restritivos no que se refere aos açúcares que utilizam e isto dita quais os açúcares que são melhores de produzir durante a conversão. À medida que se aproximam os limites de recursos não renováveis, o potencial da celulose para se tornar um recurso energético renovável importante é enorme (Krishna *et al.*, 2001). A utilização eficaz de celulose através de processos biológicos é uma abordagem para ultrapassar a escassez de alimentos, rações e combustíveis (Ohmiya *et al.*, 1997).

As celulases são enzimas que hidrolisam celulose (elementos de ligação beta-1,4-glucano ou beta-D-glucosídico) resultando na formação de glucose, cellobiose, celo-

oligossacáridos, e outros. As celulases têm sido tradicionalmente divididas em três classes principais: endoglucanases (EC 3.2.1.4) ("EG"), exoglucanases ou celobio-hidrolases (EC 3.2.1.91) ("CBH") e beta-glucosidases ([beta]-D-glucósido-gluco-hidrolases (EC 3.2.1.21) ("BG"). (Knowles *et al.*, 1987 e Shulein, 1988). As endoglucanases actuam principalmente sobre as partes amorfas da fibra de celulose, enquanto as celobio-hidrolases são também capazes de degradar celulose cristalina.

As celulases têm também mostrado ser úteis na degradação de biomassa de celulose em etanol (onde as celulases degradam a celulose em glucose e levedura ou outros micróbios fermentam adicionalmente glucose em etanol), no tratamento de pasta mecânica (Pere *et al.*, 1996), para utilização como um aditivo de rações (WO 91/04673) e na moagem a húmido de cereais. A sacarificação e fermentação em separado são um processo pelo qual celulose presente na biomassa, *e.g.*, palha de milho, é convertida em glucose e, subsequentemente, estirpes de levedura convertem glucose em etanol. A sacarificação e a fermentação simultâneas são um processo pelo qual celulose presente na biomassa, *e.g.*, palha de milho, é convertida em glucose e, ao mesmo tempo e no mesmo reactor, estirpes de levedura convertem glucose em etanol. A produção de etanol a partir de fontes de celulose prontamente disponíveis proporciona uma fonte renovável de combustíveis, estável.

É conhecido que as celulases são produzidas por um grande número de bactérias, leveduras e fungos. Certos fungos produzem um sistema de celulase completo (*i.e.*, uma celulase inteira) capaz de degradar formas cristalinas de celulose. De modo a converter eficientemente celulose cristalina em glucose, é requerido o sistema de celulase completo compreendendo componentes de cada uma das classificações CBH, EG e BG, com componentes isolados menos eficazes na hidrólise de celulose cristalina (Filho *et al.*, 1996). Em particular, a combinação de celulases do tipo EG e de celulases do tipo CBH interage para degradar mais eficientemente celulose do que qualquer das enzimas utilizada sozinha (Wood, 1985; Baker *et al.*, 1994; e Nieves *et al.*, 1995).

Adicionalmente, é conhecido na especialidade que as celulases são úteis no tratamento de têxteis com o propósito de melhorar a capacidade de limpeza de composições de detergente, para utilização como um agente amaciador, para melhorar o toque e o aspecto de tecidos de algodão, e outros (Kumar et al., 1997). Foram descritas composições de detergente contendo celulase com desempenho de limpeza melhorado (Patente dos E.U.A. N.º 4 435 307; Pedidos de Patente GB N.^{os} 2 095 275 e 2 094 826) e para utilização no tratamento de tecido para melhorar o toque e o aspecto do tecido (Patente dos E.U.A. N.^{os} 5 648 263, 5 691 178 e 5 776 757, e Pedido de Patente GB N.º 1 358 599).

Por isso, celulases produzidas em fungos e bactérias têm recebido uma atenção significativa. Em particular, a fermentação de espécies *Trichoderma* (e.g., *Trichoderma longibrachiatum* ou *Trichoderma reesei*) tem mostrado produzir um sistema de celulase completo capaz de degradar formas cristalinas de celulose. Ao longo dos anos, a produção de celulase de *Trichoderma* tem sido melhorada por mutagénese clássica, rastreio, selecção e desenvolvimento de condições de fermentação baratas em grande escala, altamente refinadas. Embora o sistema de celulase multicomponente de espécies *Trichoderma* seja capaz de hidrolisar celulose em glucose, existem celulases de outros microrganismos, particularmente estírpes bacterianas, com diferentes propriedades para uma hidrólise de celulose eficiente, e seria vantajoso expressar estas proteínas num fungo filamentoso para produção de celulase à escala industrial. No entanto, os resultados de muitos estudos demonstram que o rendimento em enzimas bacterianas a partir de fungos filamentosos é baixo (Jeeves et al., 1991).

Açúcares solúveis, tais como glucose e celobiose, possuem uma multiplicidade de utilizações na indústria, para a produção de produtos químicos e biológicos. A optimização da hidrólise de celulose permite a utilização de quantidades inferiores de enzima e uma eficácia melhorada em termos de custo para a produção de açúcares solúveis. Apesar do desenvolvimento de numerosas abordagens, subsiste uma necessidade na especialidade para melhorar o rendimento de açúcares solúveis obtidos a partir de materiais celulósicos.

Tolan (Clean Tech Environ Policy, 2002, 339-345) revela uma visão geral de um processo para produção de etanol a partir de biomassa celulósica, incluindo a utilização de celulase numa reacção de hidrólise por celulase. O material celulósico é processado na reacção de hidrólise durante 5 a 7 dias a 50°C.

Vlikara et al. (Advances in Biochem. Engin./Biotechnol., 2007, 121-145) revelam uma comparação de enzimas termoestáveis e celulases comerciais na hidrólise de lignocelulose.

A WO 2005/001065 revela uma variante de CBH1.1 de *Humicola grisea* possuindo actividade de celobio-hidralase.

5. SUMÁRIO

Os presentes ensinamentos proporcionam métodos para aumentar o rendimento de açúcares solúveis a partir da sacariação enzimática de matérias-primas celulósicas por incubação de um substrato celulósico ou de um substrato celulósico pré-tratado com uma celulase inteira de *Trichoderma reesei* a uma temperatura entre 50°C e 65°C durante 0,1 horas a 96 horas a um pH de 4 a 9. Os presentes ensinamentos proporcionam também métodos para aumentar o rendimento de glucose a partir da sacariação enzimática de matérias-primas celulósicas por incubação de um substrato celulósico ou de um substrato celulósico pré-tratado com uma celulase a uma temperatura de ou próxima da temperatura de desnaturação térmica da celulase.

São também proporcionados métodos para conversão de um material celulósico em glucose por combinação de um material celulósico com uma celulase, incubando a combinação de material celulósico e celulase a uma temperatura superior a cerca de 38°C para fazer com que uma reacção de hidrólise converta pelo menos 20% do referido material celulósico em açúcares solúveis, onde a fracção de glucose é pelo menos 0,75 em relação aos açúcares solúveis. O presente ensinamento proporciona adicionalmente métodos para conversão de um material celulósico em celobiose por combinação de um

material celulósico com uma mistura de enzima compreendendo uma endoglucanase 1, a incubação da combinação de material celulósico e celulase faz com que uma reacção de hidrólise converta até 50% do material celulósico em açúcares solúveis, onde a fracção de glucose é inferior a cerca 0,5 em relação aos referidos açúcares solúveis.

As celulases são celulases inteiras, misturas de celulase inteira ou suas combinações produzidas por microrganismos de espécies *Trichoderma reesei*.

Estas e outras particularidades dos presentes ensinamentos são aqui apresentadas.

6. BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O técnico competente compreenderá que os desenhos são apenas para efeitos de ilustração e não devem ser entendidos para limitar de modo algum o âmbito dos presentes ensinamentos.

As FIGS. 1A-B mostra a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 3,3 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase, a 38°C (símbolos vazios) e a 53°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 2A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 12 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase, a 38°C (símbolos vazios) e 53°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 3A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 18 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase 1, 38°C (símbolos vazios) e 53°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 4A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 20 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando

beta-glucosidase, a 38°C (símbolos vazios) e 53°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 5A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 20 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase, a 38°C (símbolos vazios) e 53°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 6A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 12 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei*, a 38°C (símbolos vazios) e 53°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 7A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 12 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* expressando uma proteína de fusão CBH1-E1, a 38°C (símbolos vazios) e 53°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 8A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 15 mg/g de uma mistura de enzimas quer de EG1 e CBH1 de *T. reesei* (quadrados) quer de E1 e CBH1 de *H. grisea* (círculos), a 38°C (símbolos vazios) e 65°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 9A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 15 mg/g de uma mistura de enzimas quer de EG1, CBH1 de *T. reesei* e CBH2 de *T. reesei* (quadrados) quer de E1, CBH1 de *H. grisea* e CBH2 de *T. reesei* (círculos), a 38°C (símbolos vazios) e 65°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 10A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 15 mg/g de uma mistura de enzimas quer de EG1, CBH1 de *T. reesei* (quadrados) e E3 de *T. fusca* quer de E1, CBH1 de *H. grisea* e E3 de *T. fusca* (círculos), a 38°C (símbolos vazios) e 65°C (símbolos a cheio).

As FIGS. 11A-F mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por uma

estirpe *Trichoderma reesei* a 53°C (símbolos a cheio) e 59°C (símbolos vazios)

As FIGS. 12A-F mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por uma celulase inteira de *Trichoderma reesei* expressando uma proteína de fusão CBH1-E1, a 53°C (símbolos a cheio) e 59°C (símbolos vazios).

7. DESCRIÇÃO DETALHADA DE VÁRIAS CONCRETIZAÇÕES

A não ser que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que habitualmente entendido por um técnico competente na especialidade à qual este invento pertence. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2.nd ED., John Wiley and Sons, New York (1994), e Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, N.Y. (1991) proporcionam a um técnico competente um dicionário geral de muitos dos termos utilizados neste invento. Embora na prática ou ensaio do presente invento possam ser utilizados quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos, são descritos os métodos e materiais preferidos. Os intervalos numéricos são inclusivos dos números definindo o intervalo. Deve ser entendido que este invento não está limitado à metodologia, protocolos e reagentes particulares descritos, uma vez que estes podem variar.

Os títulos aqui proporcionados não são limitações dos vários aspectos ou concretizações do invento, que podem ser obtidos por referência ao fascículo como um todo. Por conseguinte, os termos definidos imediatamente abaixo são mais detalhadamente definidos por referência ao fascículo como um todo.

O termo "celulase" refere-se a uma categoria de enzimas capaz de hidrolisar polímeros de celulose (elementos de ligação beta-1,4-glucano ou beta-D-glucosídicos) em oligómeros de celo-oligossacárido, celobiose e/ou glucose.

O termo "exocelobio-hidrolase" (CBH) refere-se a um grupo de enzimas celulase classificadas com EC 3.2.1.91. Estas enzimas são também conhecidas como exoglucanases ou celobio-hidrolases. As enzimas CBH hidrolisam celobiose a partir da extremidade redutora ou não redutora de celulose. Em geral, uma enzima do tipo CBHI hidrolisa preferencialmente celobiose a partir da extremidade redutora de celulose e uma enzima do tipo CBHII hidrolisa preferencialmente a extremidade não redutora de celulose.

O termo "actividade de celobio-hidrolase" é aqui definido como uma actividade de 1,4-D-glucano-celobio-hidrolase (E.C. 3.2.1.91) que catalisa a hidrólise de elementos de ligação 1,4-beta-D-glucosídico em celulose, celotetriose ou qualquer polímero contendo glucose ligado em beta-1,4, libertando celobiose a partir das extremidades da cadeia. Para efeitos do presente invento, a actividade de celobio-hidrolase pode ser determinada pela libertação de açúcar redutor solúvel em água a partir de celulose conforme medido pelo método de PHBAH de Lever *et al.*, 1972, *Anal. Biochem.* 47: 273-279. Uma distinção entre o modo de ataque de exoglucanase de uma celobio-hidrolase e o modo de ataque de endoglucanase pode ser feita por uma medição similar da libertação de açúcar redutor a partir de celulose substituída, tal como carboximetilcelulose ou hidroxietilcelulose (Ghose, 1987, *Pure & Appl. Chem.* 59: 257-268). Uma celobio-hidrolase verdadeira terá uma razão muito elevada de actividade sobre celulose não substituída *versus* celulose substituída (Bailey *et al.*, 1993, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 65-76).

O termo "endoglucanase" (EG) refere-se a um grupo de enzimas celulase classificadas como EC 3.2.1.4. Uma enzima EG hidrolisa ligações glucosídicas beta-1,4 internas da celulose. O termo "endoglucanase" é aqui definido como uma endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glucano-4-glucano-hidrolase (E.C. N.º 3.2.1.4) que catalisa a endo-hidrólise de elementos de ligação 1,4-beta-D-glicosídicos em celulose, derivados de celulose (por exemplo, carboximetilcelulose), liquenina, ligações beta-1,4 em beta-1,3-glucanos mistos tais como beta-D-glucanos de cereal ou xiloglucanos, e outro material de plantas contendo componentes celulósicos. Para efeitos do

presente invento, a actividade de endoglucanase pode ser determinada utilizando hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) de acordo com o procedimento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268.

O termo "beta-glucosidase" é aqui definido como uma beta-D-glucósido-gluco-hidrolase (E.C. 3.2.1.21) que catalisa a hidrólise de celobiose com a libertação de beta-D-glucose. Para efeitos do presente invento, a actividade de beta-glucosidase pode ser medida por métodos conhecidos na especialidade, e.g., HPLC.

"Actividade celulolítica" abrange actividade de exoglucanase, actividade de endoglucanase ou ambos os tipos de actividade enzimática, bem como actividade de beta-glucosidase.

Muitos micróbios produzem enzimas que hidrolisam celulose, incluindo as bactérias *Acidothermus*, *Thermobifida*, *Bacillus* e *Cellulomonas*; *Streptomyces*; leveduras tais como *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* ou *Yarrowia* e os fungos *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobosidium*, *Chrysosporium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium* ou *Trichoderma*, ou suas formas sexuadas alternativas tais como *Emericella* e *Hypocrea* (Ver, Kuhls et al., 1996).

Uma composição "não de ocorrência natural" abrange aquelas composições produzidas por: (1) combinação de enzimas celulolíticas componentes quer numa proporção de ocorrência natural quer numa proporção não de ocorrência natural, i.e., alterada; ou (2) modificação de um organismo para sobre-expressar ou subexpressar uma ou mais enzimas celulolíticas; ou (3) modificação de um organismo tal que pelo menos uma enzima celulolítica seja apagada ou (4) modificação de um organismo para expressar uma enzima celulolítica componente heteróloga. As enzimas celulolíticas componentes podem ser proporcionadas como polipeptídos isolados antes da combinação para formar a composição não de ocorrência natural.

Verificámos, em parte, que a temperatura de sacarificação aumentada não só aumenta o rendimento de glucose a partir de materiais celulósicos mas também resulta numa conversão global de celulose melhorada tal que a fração de glucose no produto de conversão é aumentada para temperaturas de incubação mais elevadas.

Os presentes ensinamentos proporcionam métodos para aumentar o rendimento de açúcares solúveis a partir da sacarificação enzimática de matérias-primas celulósicas por incubação de um substrato celulósico ou substrato celulósico pré-tratado com uma celulase inteira de *Trichoderma reesei* a uma temperatura entre 50°C e 65°C durante 0,1 horas a 96 horas a um pH de 4 a 9. Os presentes ensinamentos proporcionam adicionalmente métodos para aumentar o rendimento de glucose a partir da sacarificação enzimática de matérias-primas celulósicas por incubação de um substrato celulósico ou de um substrato celulósico pré-tratado com uma celulase inteira de *Trichoderma reesei* entre 50°C e 65°C durante 0,1 horas a 96 horas a um pH de 4 a 9.

Nos métodos da presente revelação, o material celulósico pode ser qualquer material contendo celulose. O material celulósico pode incluir, mas não está limitado a, celulose, hemicelulose e materiais lignocelulósicos. Nalgumas concretizações, os materiais celulósicos incluem, mas não estão limitados a, biomassa, material herbáceo, resíduos agrícolas, produtos florestais, resíduos sólidos municipais, restos de papel, resíduos de pasta e de papel. Em algumas concretizações, o material celulósico inclui madeira, pasta de madeira, lama do fabrico de papel, correntes residuais de pasta de papel, partículas de cartão, palha de milho, fibra de milho, arroz, resíduos do processamento de papel e de pasta, plantas lenhosas ou herbáceas, polpa de fruta, polpa de vegetais, pedra-pomes (*pumice*), grãos de destilaria, ervas, cascas de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, algodão, juta, cânhamo, linho, bambu, sisal, abacá, palha, sabugos de milho, grãos de destilaria, folhas, palha de trigo, fibras de coco, algas, painço (*Panicum virgatum*), e suas misturas (ver, por exemplo, Wiselogel et al., 1995, em *Handbook on Bioethanol* (Charles E. Wyman, editor), págs. 105-118, Taylor

& Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695-719; Mosier et al., 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocelulosics, em Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Schepers, editor responsável, Volume 65, págs. 23-40, Springer-Verlag, New York).

O material celulósico pode ser utilizado tal como está ou pode ser submetido a pré-tratamento utilizando métodos conhecidos na especialidade. Estes pré-tratamentos incluem pré-tratamento químico, físico e biológico. Por exemplo, técnicas de pré-tratamento físico podem incluir sem limitação vários tipos de trituração, esmagamento, tratamento com vapor/explosão de vapor (*steaming/steam explosion*), irradiação e hidrotermólise. Técnicas de pré-tratamento químico podem incluir sem limitação ácido diluído, base, solvente orgânico, amónia, dióxido de enxofre, dióxido de carbono e hidrotermólise controlada pelo pH. Técnicas de pré-tratamento biológico podem incluir sem limitação a aplicação de microrganismos de solubilização de lignina. O pré-tratamento pode ocorrer durante desde vários minutos a várias horas, tal como de cerca de 1 hora a cerca de 120.

Numa concretização, o pré-tratamento pode ser por temperatura elevada e pela adição de ácido diluído, ácido concentrado ou solução alcalina diluída. A solução de pré-tratamento pode ser adicionada durante um tempo suficiente para pelo menos parcialmente hidrolisar os componentes de hemicelulose e depois neutralizada.

Em algumas concretizações, o pré-tratamento é seleccionado entre um grupo consistindo de explosão de vapor, formação de pasta, trituração, hidrólise ácida e suas combinações.

Faz-se reagir a celulase inteira com o material celulósico a uma temperatura entre 50°C e 65°C. O pH é desde pH 4, cerca de pH 4,5, cerca de pH 5, cerca de pH 5,5, cerca de pH 6, cerca de pH 6,5, cerca de pH 7, cerca de pH 7,5, cerca de pH 8,0, até cerca de pH 8,5. Geralmente, o intervalo de pH será de cerca de pH 4,5 a pH 9. A incubação da celulase

sob estas condições resulta no desprendimento ou libertação de quantidades substanciais do açúcar solúvel a partir do material celulósico. Por quantidade substancial significa que pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais de açúcar solúvel é açúcar disponível.

O tratamento com celulase é de 0,1 horas a 96 horas, preferivelmente cerca de 12 horas a cerca de 72 horas, mais preferivelmente cerca de 24 a 48 horas.

A quantidade de celulase é uma função da(s) enzima(s) aplicada(s) e do tempo de reacção e das condições proporcionadas. Preferivelmente, a(s) celulase(s) pode(m) ser doseada(s) numa quantidade total de cerca de 2-40 mg/g de material celulósico.

Nos métodos da presente revelação, a celulase pode ser celulase inteira, uma celulase inteira suplementada com uma ou mais actividades de enzima e misturas de celulase. Em algumas concretizações, a celulase pode ser uma preparação de celulase inteira. Como aqui utilizada, a expressão "preparação de celulase inteira" refere-se a ambas as composições contendo celulase de ocorrência natural e não de ocorrência natural. Uma composição "de ocorrência natural" é uma composição produzida por uma fonte de ocorrência natural e que comprehende um ou mais componentes do tipo celobio-hidrolase, um ou mais componentes do tipo endoglucanase e um ou mais componentes beta-glucosidase, onde cada um destes componentes é encontrado na proporção produzida pela fonte. Uma composição de ocorrência natural é uma composição que é produzida por um organismo não modificado no que se refere às enzimas celulolíticas tal que a proporção das enzimas componentes está inalterada em relação à produzida pelo organismo nativo.

Em geral, as celulases podem incluir, mas não estão limitadas a: (i) endoglucanases (EG) ou 1,4- β -d-glucano-4-glucano-hidrolases (EC 3.2.1.4), (ii) exoglucanases, incluindo 1,4- β -d-glucano-glucano-hidrolases (também conhecidas como celodextrinases) (EC 3.2.1.74) e 1,4- β -d-glucano-celobio-hidrolases (exo-celobio-hidrolases, CBH) (EC

3.2.1.91) e (iii) β -glucosidase (BG) ou β -glucósido-glucohidrolases (EC 3.2.1.21).

A celulase inteira é uma celulase inteira de *Trichoderma reesei*, tal como RL-P37 (Sheir-Neiss et al., Appl. Microbiol. Biotechnology, 20 (1984), págs. 46-53)

Em algumas concretizações, a celulase é uma celulase inteira RutC30 de *Trichoderma reesei*, que está disponível na American Type Culture Collection como *Trichoderma reesei* ATCC 56765.

Na presente revelação, a celulase pode ser proveniente de qualquer método de cultura conhecido na especialidade resultando na expressão de enzimas capazes de hidrolisar um material celulósico. A fermentação pode incluir cultura num balão agitado, fermentação em pequena ou grande escala, tal como fermentações contínuas, descontínuas, descontínuas com alimentação ou de estado sólido, em fermentadores de laboratório ou industriais, realizadas num meio adequado e sob condições permitindo que a celulase seja expressa ou isolada.

Geralmente, o microrganismo é cultivado num meio de cultura de células adequado para produção de enzimas capazes de hidrolisar um material celulósico. A cultura decorre num meio nutriente adequado compreendendo fontes de carbono e azoto e sais inorgânicos, utilizando procedimentos conhecidos na especialidade. Meios de cultura adequados, intervalos de temperatura e outras condições adequadas para crescimento e produção de celulase, são conhecidos na especialidade. Como um exemplo não limitante, o intervalo de temperatura normal para a produção de celulases por *Trichoderma reesei* é 24°C a 28°C.

Certos fungos produzem sistemas de celulase completos que incluem exo-celobio-hidrolases ou celulases do tipo CBH, endoglucanases ou celulases do tipo EG e beta-glucosidases ou celulases do tipo BG (Schulein, 1988). No entanto, por vezes estes sistemas não possuem celulases do tipo CBH, e.g., celulases bacterianas incluem também tipicamente poucas ou nenhuma celulases do tipo CBH. Adicionalmente, foi mostrado

que os componentes EG e componentes CBH interagem sinergicamente para degradar celulose mais eficientemente. Ver, *e.g.*, Wood, 1985. Os diferentes componentes, *i.e.*, as várias endoglucanases e exocelobio-hidrolases num sistema de celulase multicomponente ou completo, têm geralmente propriedades diferentes, tais como ponto isoeléctrico, peso molecular, grau de glicosilação, especificidade por substrato e padrão de acção enzimática.

Em algumas concretizações, a celulase é utilizada tal como é produzida por fermentação, sem qualquer ou apenas com uma recuperação e/ou purificação mínimas. Por exemplo, assim que as celulases são segregadas por uma célula para o meio de cultura de células, o meio de cultura de células contendo as celulases pode ser utilizado. Em algumas concretizações a preparação de celulase inteira compreende os conteúdos não fraccionados de material de fermentação, incluindo meio de cultura de células, enzimas extracelulares e células. Alternativamente, a preparação de celulase inteira pode ser processada por qualquer método conveniente, *e.g.*, por precipitação, centrifugação, afinidade, filtração ou qualquer outro método conhecido na especialidade. Em algumas concretizações, a preparação de celulase inteira pode ser concentrada, por exemplo, e depois utilizada sem qualquer purificação adicional. Em algumas concretizações, a preparação de celulase inteira compreende agentes químicos que diminuem a viabilidade celular ou matam as células. Em algumas concretizações, as células são lisadas ou permeabilizadas utilizando métodos conhecidos na especialidade.

Uma celulase contendo uma quantidade melhorada de celobio-hidrolase e/ou beta-glucosidase encontra utilidade na produção de etanol. O etanol a partir deste processo pode ser adicionalmente utilizado como um melhorador das octanas ou directamente como um combustível em vez de gasolina, o que é vantajoso porque o etanol como uma fonte de combustível é mais amigável ambientalmente do que produtos derivados de petróleo. É conhecido que a utilização de etanol melhorará a qualidade do ar e possivelmente reduzirá os níveis locais de ozono e nevoeiro de poluição. Para além disso, a utilização de etanol em vez de gasolina pode ser de importância

estratégica no tamponamento do impacto de alterações súbitas nas energias não renováveis e nos fornecimentos petroquímicos.

O etanol pode ser produzido através de processos de sacarificação e fermentação a partir de biomassa celulósica tal como árvores, plantas herbáceas, resíduos sólidos municipais e produtos agrícolas e florestais. No entanto, a proporção de enzimas celulase individuais, numa mistura de celulase de ocorrência natural produzida por um micróbio, pode não ser a mais eficiente para conversão rápida de celulose na biomassa em glucose. É conhecido que endoglucanases actuam para produzir novas extremidades da cadeia de celulose que são elas próprias substratos para a acção de celobio-hidrolases e desse modo melhoram a eficiência de hidrólise pelo sistema de celulase inteira. Deste modo, a utilização de actividade aumentada ou optimizada de celobio-hidrolase pode melhorar grandemente a produção de etanol.

O etanol pode ser produzido por degradação enzimática de biomassa e conversão dos sacáridos libertados em etanol. Este tipo de etanol é frequentemente referido como bioetanol ou biocombustível. Pode ser utilizado como aditivo ou extensor de combustível em misturas desde menos de 1% e até 100% (um substituto de combustível).

Uma conversão de celulose melhorada pode ser conseguida a temperaturas mais elevadas utilizando os polipéptidos CBH descritos, por exemplo, em qualquer uma das Publicações de Patente dos E.U.A. seguintes US20050054039, US20050037459, US20060205042, US20050048619A1 e US20060218671. Métodos de sobre-expressão de beta-glucosidase são conhecidos na especialidade. Ver, por exemplo, US 6 022 725. Ver também, por exemplo, US20050214920.

Em algumas concretizações, a celulase é uma proteína de fusão de exocelobio-hidrolase.

Em algumas concretizações, a mistura de celulase comprehende uma celulase seleccionada entre endoglucanase 1 (EG1) de *Trichoderma reesei*, celobio-hidrolase 1 (CBH1) de

Trichoderma reesei e celobio-hidrolase 2 (CBH2) de *Trichoderma reesei*, e suas combinações.

O método da presente revelação pode ser utilizado na produção de monossacáridos, dissacáridos e polissacáridos como matérias-primas de fermentação químicas para microrganismos, e indutores para a produção de proteínas, produtos orgânicos, produtos químicos e combustíveis, plásticos, e outros produtos ou intermediários. Em particular, o valor de resíduos de processamento (grãos secos de destiladores, grãos consumidos de cervejeiras, bagaço de cana-de-açúcar, etc.) pode ser aumentado por solubilização parcial ou completa de celulose ou hemicelulose. Para além do etanol, alguns produtos químicos que podem ser produzidos a partir de celulose e hemicelulose incluem, acetona, acetato, glicina, lisina, ácidos orgânicos (e.g., ácido láctico), 1,3-propanodiol, butanodiol, glicerol, etilenoglicol, furfural, poli-hidroxialcanoatos, cis, ácido cis-mucónico, alimentos para animais e xilose.

O presente ensinamento proporciona métodos como revelados acima para conversão de um material celulósico em glucose compreendendo a combinação de um material celulósico com uma celulase, incubação da referida combinação de material celulósico e celulase, fazer com que uma reacção de hidrólise converta material celulósico em açúcares solúveis, onde os referidos açúcares solúveis compreendem glucose e cellobiose e a fracção de glucose é pelo menos 0,75 em relação aos referidos açúcares solúveis.

O presente ensinamento proporciona adicionalmente métodos como revelados acima para conversão de um material celulósico em cellobiose, compreendendo combinação de um material celulósico com uma mistura de celulase compreendendo uma endoglucanase 1.

Em algumas concretizações, os métodos da presente revelação compreendem adicionalmente o passo de determinação da quantidade de glucose e/ou de açúcares solúveis.

São também proporcionados métodos como revelados acima para conversão de um material celulósico em glucose

compreendendo os passos de combinação de um material celulósico com uma celulase tal que a combinação resultante de material celulósico e celulase tem 1% a cerca de 30% de celulose em peso.

São aqui proporcionados métodos como revelados acima para conversão de um material celulósico em celobiose compreendendo os passos de combinação de um material celulósico com uma mistura de celulase compreendendo uma endoglucanase 1.

O presente invento é descrito em mais detalhe nos exemplos seguintes que não se pretende que limitem de modo algum o âmbito do invento conforme reivindicado. Pretende-se que as Figuras anexas sejam consideradas como partes integrantes do fascículo e descrição do invento.

Aspectos dos presentes ensinamentos podem ser adicionalmente compreendidos à luz dos exemplos seguintes, que não devem ser entendidos como limitantes do âmbito dos presentes ensinamentos.

7. EXEMPLOS

A conversão foi avaliada por técnicas conhecidas na especialidade. Ver, por exemplo, Baker *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol. 70-72:395-403 (1998) e como descrito abaixo. Carregaram-se cento e cinquenta microlitros de substrato por poço numa placa de microtitulação (MTP) de 96 poços de fundo plano utilizando uma pipeta repetidora. Adicionaram-se por cima vinte microlitros de solução de enzima apropriadamente diluída. Cobriram-se as placas com tampas de chapa de alumínio e colocaram-se em incubadoras a qualquer das temperaturas de teste, com agitação, durante os tempos especificados. Terminou-se a reacção por adição de 100 µl de glicina 100 mM, pH 10, a cada poço. Com mistura exaustiva, filtraram-se os seus conteúdos através de uma placa de filtro de 96 poços Millipore (0,45 µm, PES). Diluiu-se o filtrado numa placa contendo 100 µl de glicina 10 mM, pH 10, e mediu-se por HPLC a quantidade de açúcares solúveis produzidos. Os HPLCs Agilent da série 1100 estavam todos equipados com uma pré-coluna de guarda/remoção de partículas (Biorad #125-0118)

e uma coluna de análise de carboidratos Aminex (Aminex HPX-87P). A fase móvel foi água com um caudal de 0,6 ml/min.

Palha de milho pré-tratada (PCS) - Palha de milho foi pré-tratada com H_2SO_4 a 2% p/p como descrito em Schell, D. et al., J. Appl. Biochem. Biotechnol. 105:69 - 86 (2003) e seguiram-se múltiplas lavagens com água desionizada para obter um pH de 4,5. Adicionou-se acetato de sódio para perfazer uma concentração final de 50 mM e titulou-se a solução até pH 5,0. A concentração de celulose na mistura reaccional era aproximadamente 7%.

Utilizando as celulases seguintes: celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase 1 (WC - BGL1) (ver por exemplo, Patente dos E.U.A. N.º 6 022 725, celulase inteira de *Trichoderma reesei* expressando uma proteína de fusão CBH1-E1 (WC - CBH1-E1) (ver por exemplo, Publicação da Patente dos E.U.A. N.º 20060057672), endoglucanase 1 (EG1) de *Trichoderma reesei*, celobio-hidrolase 1 (CBH1) de *Trichoderma reesei* e celobio-hidrolase 2 (CBH2) de *Trichoderma reesei*, celobio-hidrolase 1 (CBH1) de *Humicola grisea* e endoglucanase E1 (E1) de *Acidothermus cellulolyticus*, exocelulase E3 de *Thermomonospora fusca*. A quantidade de enzima foi fornecida em miligramas por gramas de celulose. Os resultados estão resumidos nas FIGS. 1-12. A ordenada representa a fracção de glucose em relação ao açúcar total (base p/p). Por exemplo, na FIG. 1-10, (A) a ordenada representa a duração do tempo de conversão e na FIG. 1-10, (B) a abscissa representa a conversão de açúcar solúvel total que é observada (cada tempo de incubação não está explicitamente assinalado mas um tempo de incubação mais tardio é indicado por uma conversão mais elevada).

As FIGS. 1A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 3,3 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase, a 38°C (símbolos vazios) e 53°C (símbolos a cheio). Celulase inteira de *T. reesei* com níveis elevados de β -glucosidase converte palha de milho pré-tratada com ácido numa fracção mais elevada de glucose a 53°C do que a 38°C.

As FIGS. 2A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 12 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase, a 38°C (ícones vazios) e 53°C (ícones cheios). Celulase inteira de *T. reesei* com níveis elevados de β-glucosidase converte palha de milho pré-tratada com ácido numa fracção mais elevada de glucose a 53°C do que a 38°C.

As FIGS. 3A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 18 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase, a 38°C (ícones vazios) e 53°C (ícones cheios). Celulase inteira de *T. reesei* com níveis elevados de β-glucosidase converte palha de milho pré-tratada com ácido numa fracção mais elevada de glucose a 53°C do que a 38°C.

As FIGS. 4A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 20 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase 1 a 38°C (ícones vazios) e 53°C (ícones cheios). Celulase inteira de *T. reesei* com níveis elevados de β-glucosidase converte palha de milho pré-tratada com ácido numa fracção mais elevada de glucose a 53°C do que a 38°C.

As FIGS. 5A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 25 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei* sobre-expressando beta-glucosidase, a 38°C (ícones vazios) e 53°C (ícones cheios). Celulase inteira de *T. reesei* com níveis elevados de β-glucosidase converte palha de milho pré-tratada com ácido numa fracção mais elevada de glucose a 53°C do que a 38°C.

As FIGS. 6A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 12 mg/g de celulase inteira de *Trichoderma reesei*, a 38°C (ícones vazios) e 53°C (ícones cheios). Celulase inteira de *T. reesei* converte palha de milho pré-tratada com ácido numa fracção mais elevada de glucose a 53°C do que a 38°C.

As FIGS. 7A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 12 mg/g de

celulase inteira de *Trichoderma reesei* expressando uma proteína de fusão CBH1-E1, a 38°C (símbolos vazios) e 53°C (símbolos a cheio). Celulase inteira de *T. reesei* converte palha de milho pré-tratada com ácido numa fracção mais elevada de glucose a 53°C do que a 38°C.

As FIGS. 8A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 15 mg/g de uma mistura de celulases composta de quer EG1 de *T. reesei* e CBH1 de *T. reesei* (quadrados) quer E1 e CBH1 de *H. grisea* (círculos), a 38°C (símbolos vazios) e 65°C (símbolos a cheio). Misturas de celulase contendo E1 convertem palha de milho pré-tratada com ácido numa maior fracção de celobiose do que misturas contendo EG1.

As FIGS. 9A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 15 mg/g de uma mistura de celulases composta de quer EG1, CBH1 de *T. reesei* e CBH2 de *T. reesei* (quadrados) quer E1, CBH1 de *H. grisea* e CBH2 de *T. reesei* (círculos), a 38°C (símbolos vazios) e 65°C (símbolos a cheio). Misturas de celulase contendo E1 convertem palha de milho pré-tratada com ácido numa maior fracção de celobiose do que misturas contendo EG1.

As FIGS. 10A-B mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por 15 mg/g de uma mistura de celulases composta de quer EG1, CBH1 de *T. reesei* e E3 de *T. fusca* (quadrados) quer E1, CBH1 de *H. grisea* e E3 de *T. fusca* (círculos), a 38°C (símbolos vazios) e 65°C (símbolos a cheio). Misturas de celulase contendo E1 convertem palha de milho pré-tratada com ácido numa maior fracção de celobiose do que misturas contendo EG1.

As FIGS. 11A-F mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por celulase inteira de *Trichoderma reesei* a 53°C (símbolos a cheio) e 59°C (símbolos vazios) durante 1 dia (A e B), 2 dias (C e D) e 3 dias (E e F). A ordenada representa a fracção de glucose em relação ao açúcar total (base p/p) (A, B e E). A abscissa representa a dose de enzima utilizada (B, D e E). A abscissa representa a conversão de açúcar solúvel total que é observada (cada dose não está explicitamente assinalada, mas

a dose mais elevada é indicada pela conversão mais elevada). Celulase inteira de *T. reesei* converte palha de milho pré-tratada com ácido numa fracção mais elevada de glucose a temperaturas elevadas.

As FIGS. 12A-F mostram a conversão de palha de milho tratada com ácido diluído em açúcares solúveis por celulase inteira de *Trichoderma reesei* expressando uma proteína de fusão CBH1-E1, a 53°C (símbolos a cheio) e 59°C (símbolos vazios) para 1 (A e B), 2 (C e D) e 3 (E e F) dias. A ordenada representa a fracção de glucose em relação ao açúcar total (base p/p) (A, C e E). A abscissa representa a dose de enzima utilizada (B, D e F). A abscissa representa a conversão de açúcar solúvel total que é observada (cada dose não está explicitamente assinalada, mas a dose mais elevada é indicada pela conversão mais elevada). Celulose inteira de *T. reesei* converte palha de milho pré-tratada com ácido numa fracção mais elevada de glucose a temperaturas elevadas.

É entendido que os exemplos e concretizações aqui descritas são apenas para fins ilustrativos.

Lisboa, 2012-07-30

REIVINDICAÇÕES

1. Método para conversão de um material celulósico em glucose compreendendo os passos de:

combinação de um material celulósico com uma celulase inteira de *Trichoderma reesei* tal que a combinação resultante de material celulósico e celulase tem 1% a 30% de celulose em peso; e

incubação da referida combinação de material celulósico e celulase a uma temperatura entre 50°C e 65°C durante 0,1 horas a 96 horas a um pH de 4 a 9 para fazer com que uma reacção de hidrólise converta pelo menos 20% do referido material celulósico em açúcares solúveis,

onde os referidos açúcares solúveis compreendem glucose e celobiose, e a fracção de glucose é pelo menos 0,75 em relação aos referidos açúcares solúveis e o rendimento em glucose aumenta a temperaturas de incubação acima de 50°C em comparação com o rendimento de glucose a uma temperatura de incubação de 38°C.

2. Método da reivindicação 1, onde a referida *Trichoderma reesei* expressa uma enzima recombinante.

3. Método da reivindicação 2, onde a referida enzima recombinante é uma beta-glucosidase.

4. Método para conversão de um material celulósico em celobiose compreendendo os passos de:

combinação de um material celulósico com uma mistura de celulase inteira de *Trichoderma reesei* compreendendo uma endoglucanase 1 tal que a combinação resultante de mistura de material celulósico e celulase tem 1% a 30% de celulose em peso; e

incubação da referida combinação de material celulósico e celulase a uma temperatura entre 50°C e 65°C durante 0,1 horas a 96 horas a um pH de 4 a 9 para fazer com que uma reacção de hidrólise converta até 50% do referido material celulósico em açúcares solúveis,

onde os referidos açúcares solúveis compreendem glucose e celobiose, e a fracção de glucose é inferior a 0,5 em relação aos referidos açúcares solúveis e o rendimento de glucose aumenta a temperaturas de incubação acima de 50°C em

comparação com o rendimento de glucose a uma temperatura de incubação de 38°C.

5. Método de qualquer uma das reivindicações precedentes, onde o material celulósico é seleccionado entre o grupo consistindo de colheitas para bioenergia, resíduos agrícolas, resíduos sólidos municipais, resíduos sólidos industriais, resíduos de jardim, madeira, resíduos florestais, painço, resíduos de papel, lama do fabrico de papel, grãos de milho, sabugos de milho, cascas de milho, palha de milho, ervas, trigo, palha de trigo, feno, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, sorgo, soja, árvores, cevada e palha de cevada.

6. Método de qualquer uma das reivindicações precedentes compreendendo adicionalmente o pré-tratamento do referido material celulósico.

7. Método da reivindicação 6, onde o referido pré-tratamento é seleccionado entre um grupo consistindo de explosão de vapor, formação de pasta, Trituração, hidrólise ácida e suas combinações.

8. Método de qualquer uma das reivindicações precedentes compreendendo adicionalmente a determinação da quantidade de glucose.

9. Método de qualquer uma das reivindicações precedentes compreendendo adicionalmente a determinação da quantidade de açúcares solúveis.

10. Método de qualquer uma das reivindicações precedentes, onde a quantidade da referida mistura de celulase tem cerca de 2 mg - 40 mg/g de material celulósico.

11. Método da reivindicação 4, onde a referida mistura de celulase compreende adicionalmente uma celobio-hidrolase 1.

12. Método da reivindicação 4, onde a referida mistura de celulase compreende adicionalmente uma celobio-hidrolase 2.

13. Método da reivindicação 4, onde a referida mistura de celulase compreende adicionalmente E3 de *Thermomonospora fusca*.

Lisboa, 2012-07-30

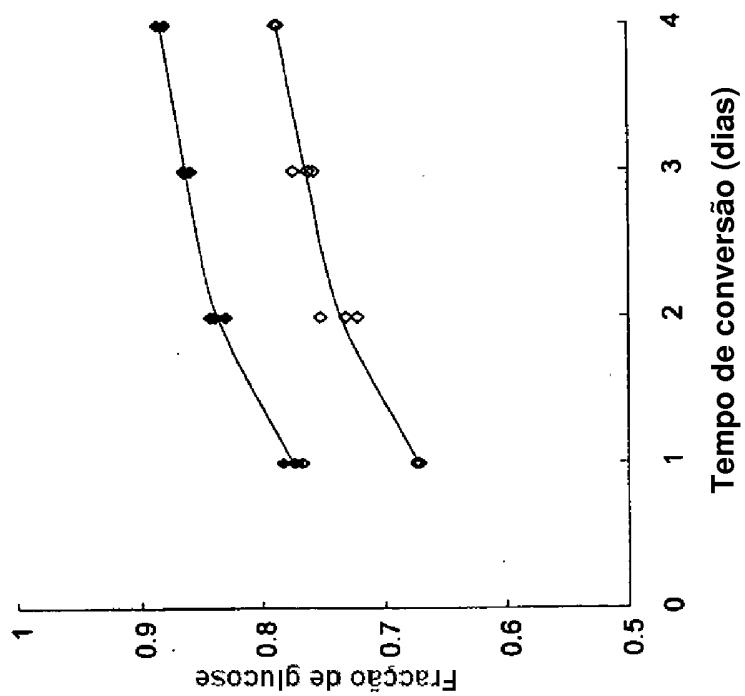
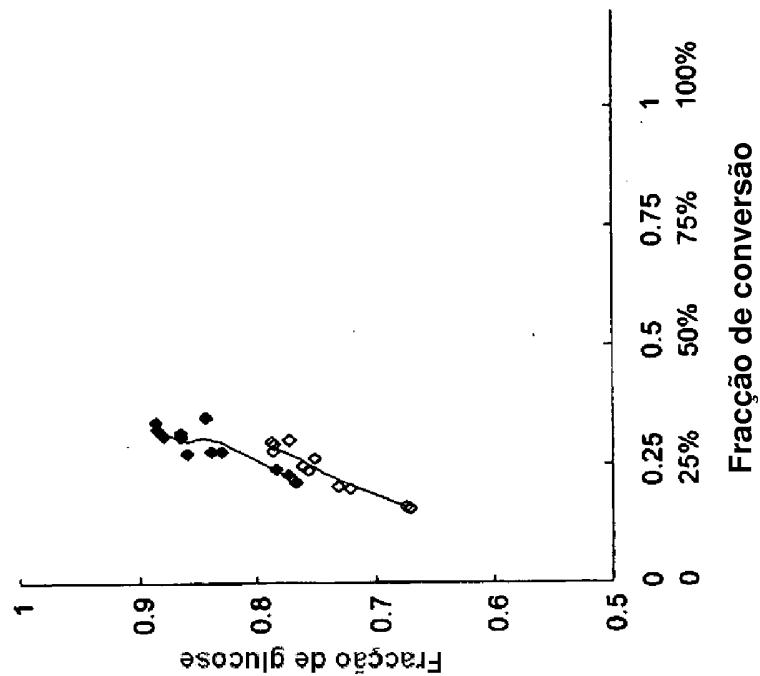
FIG. 1(A)**FIG. 1(B)**

FIG. 2(A)

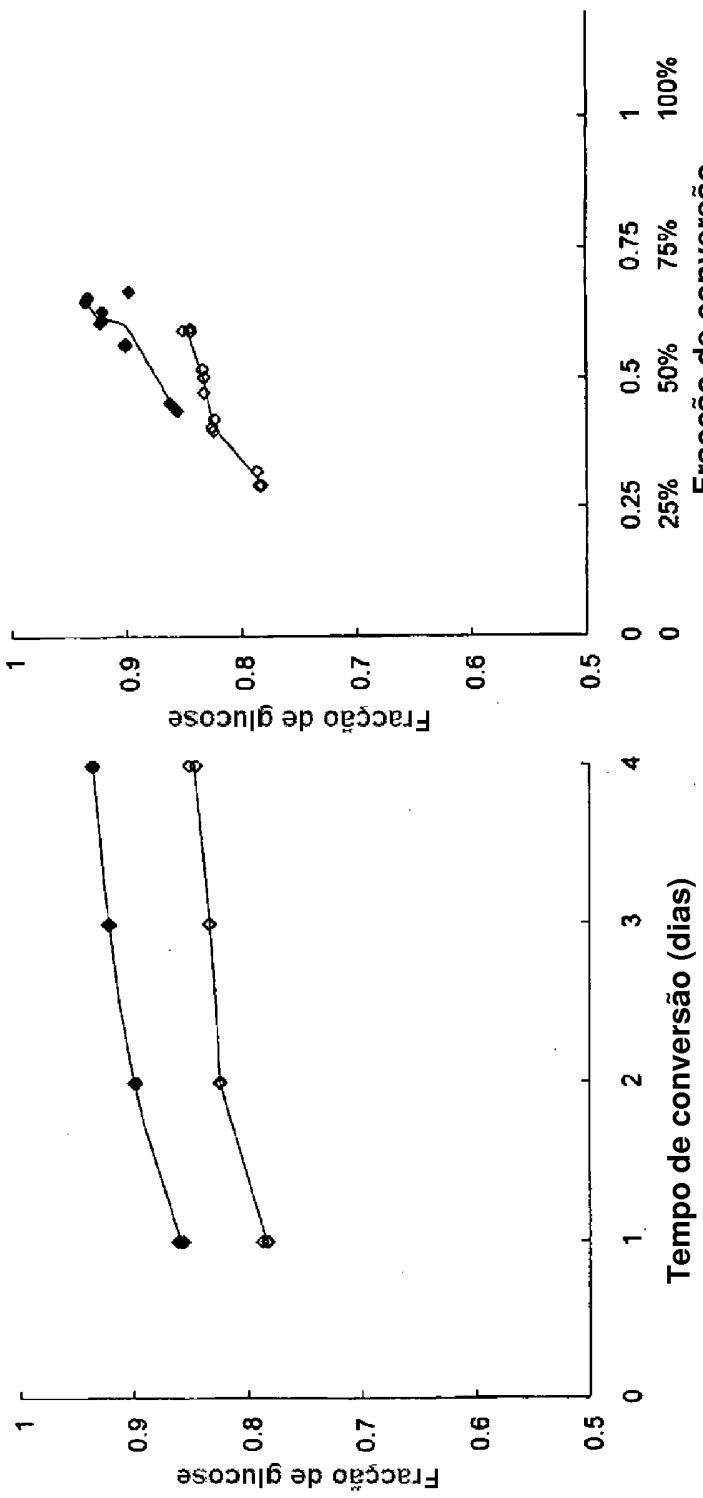


FIG. 2(B)

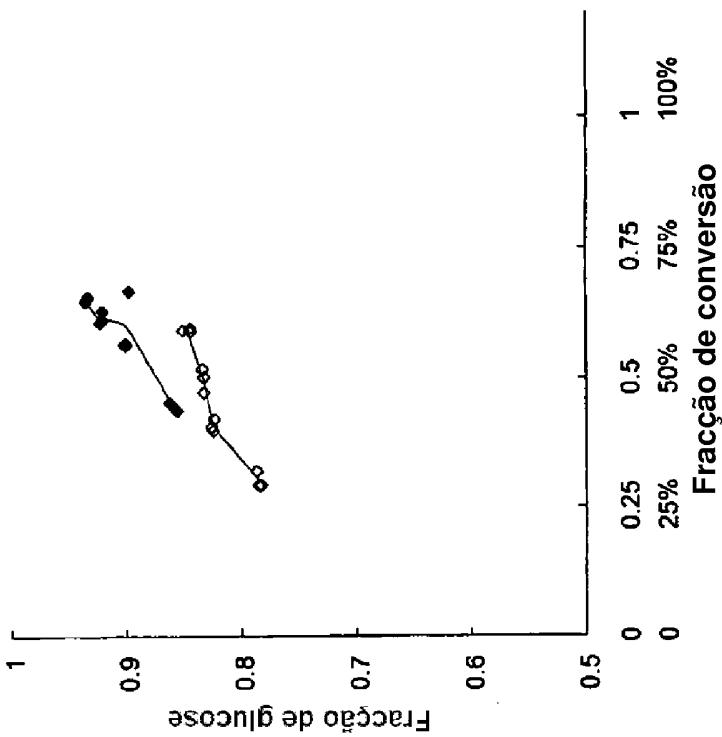


FIG. 3(A)

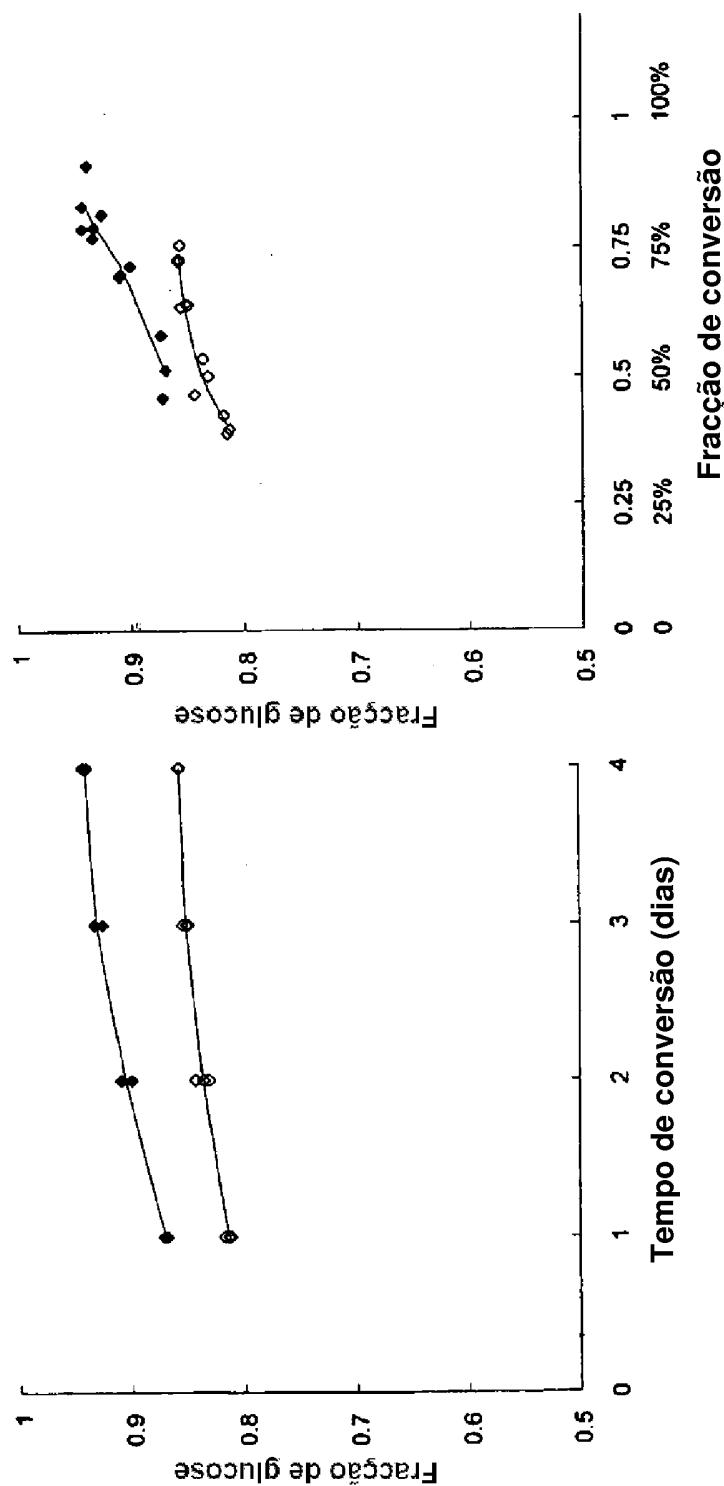


FIG. 3(B)

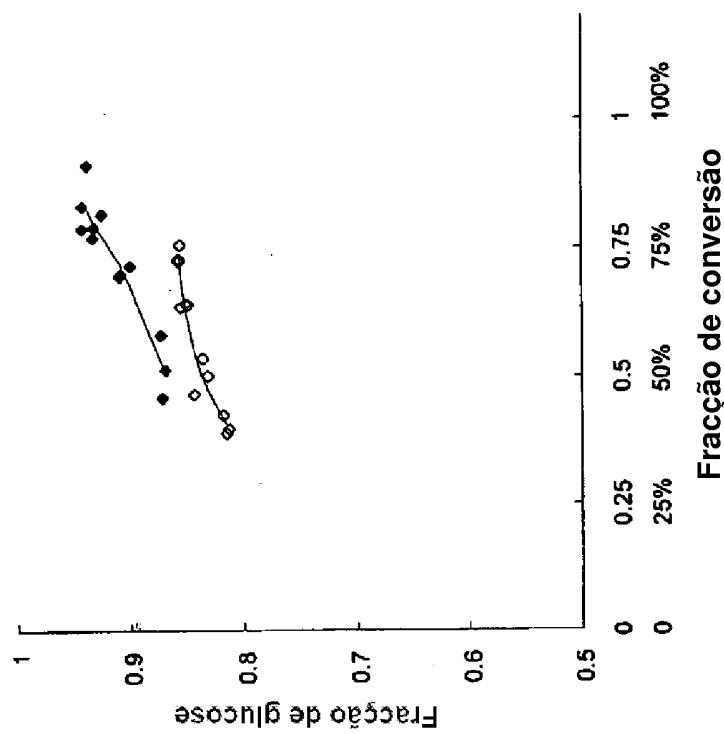


FIG. 4(A)

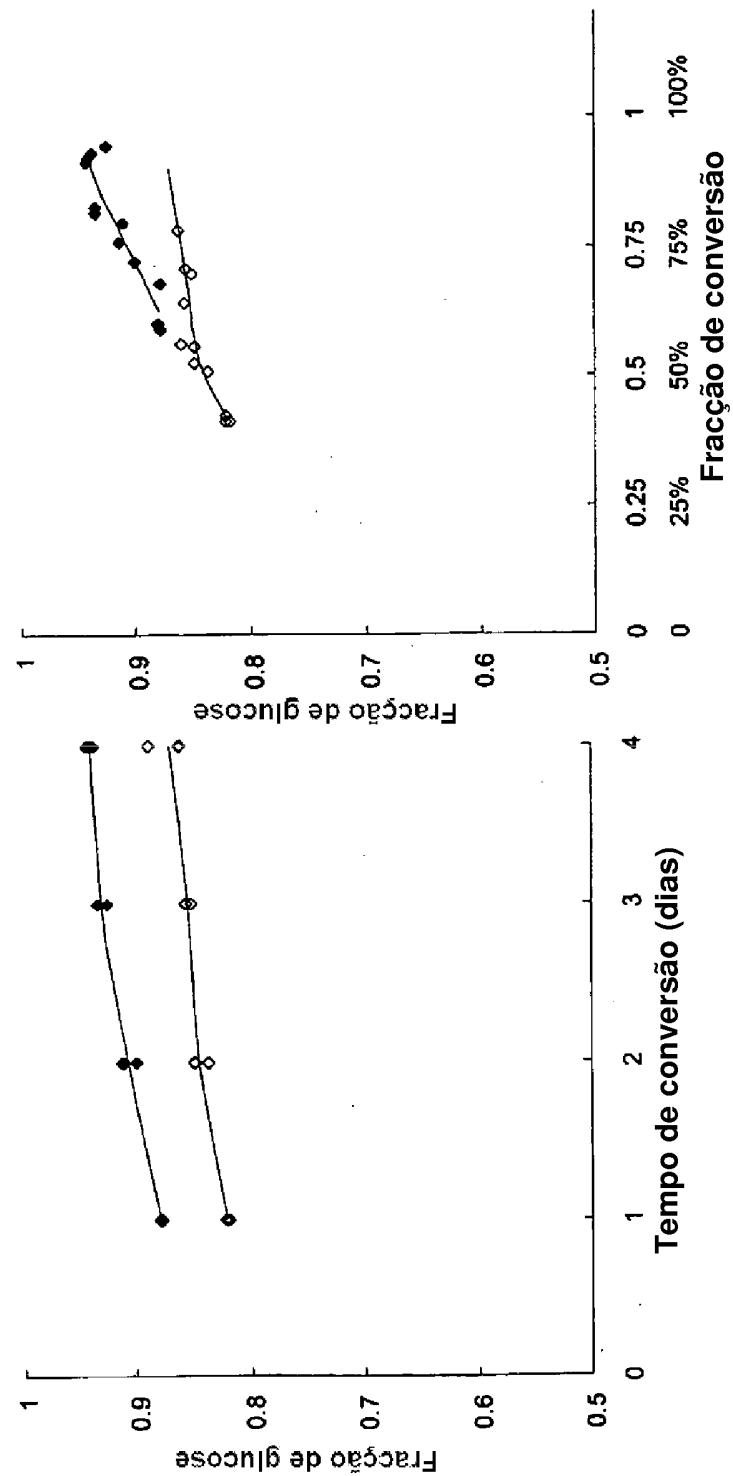


FIG. 4(B)

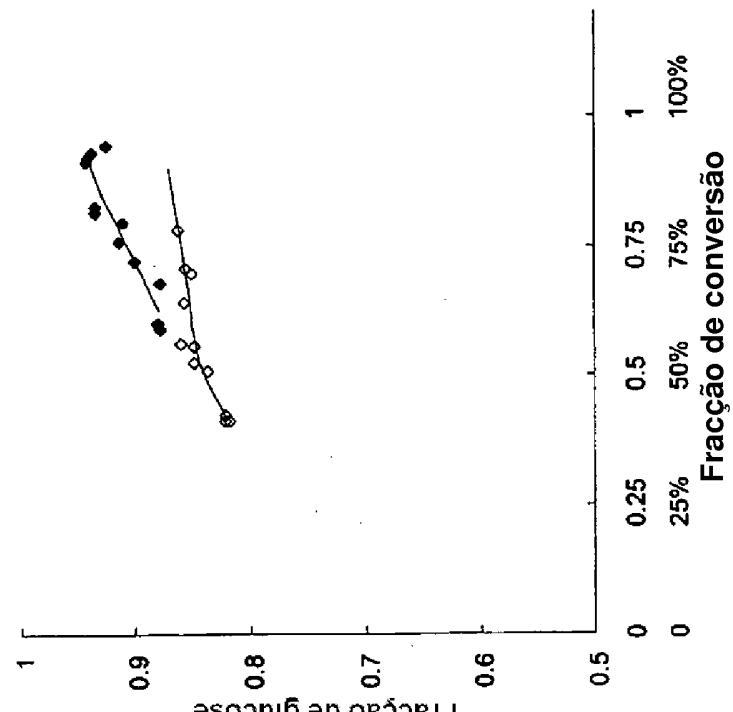


FIG. 5(A)

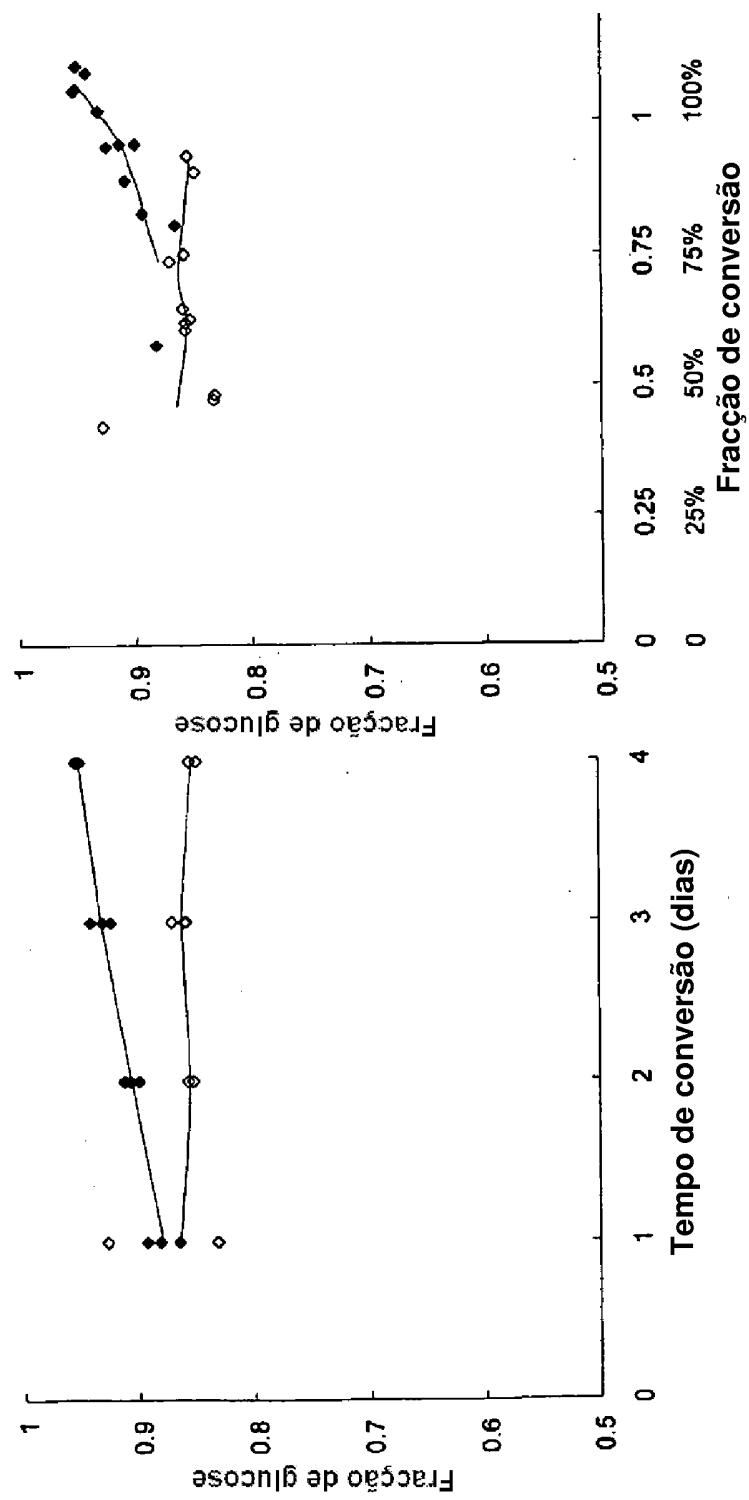


FIG. 5(B)

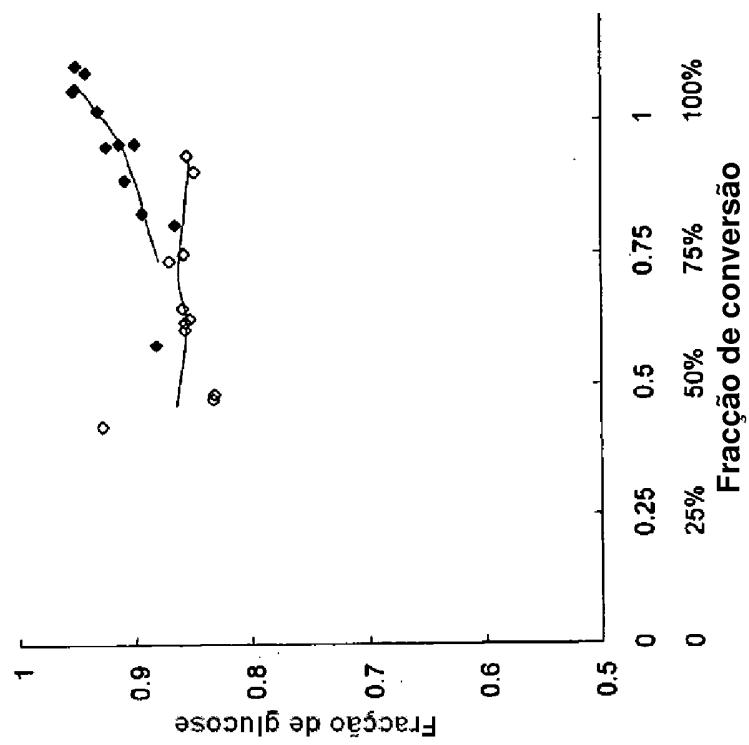


FIG. 6(A)

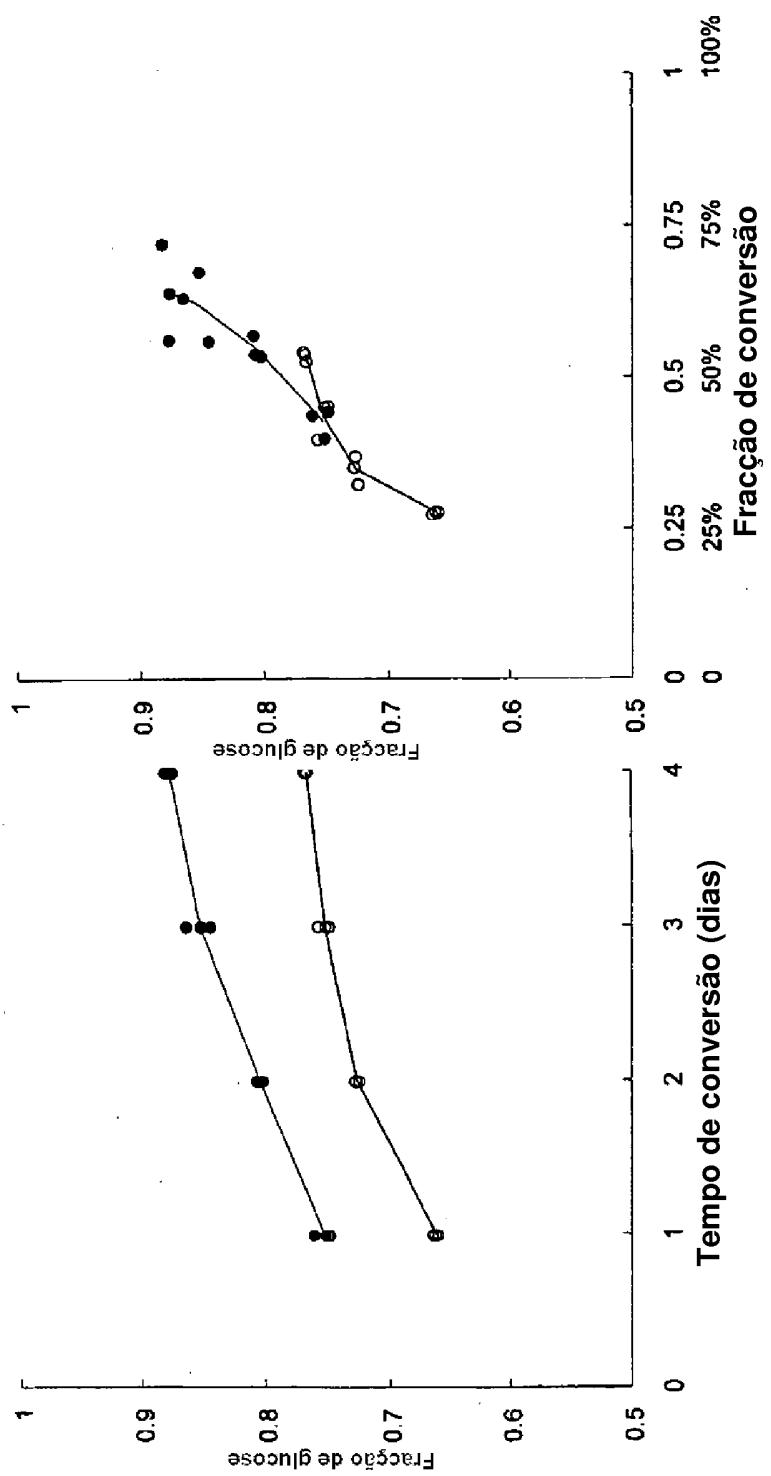


FIG. 6(B)

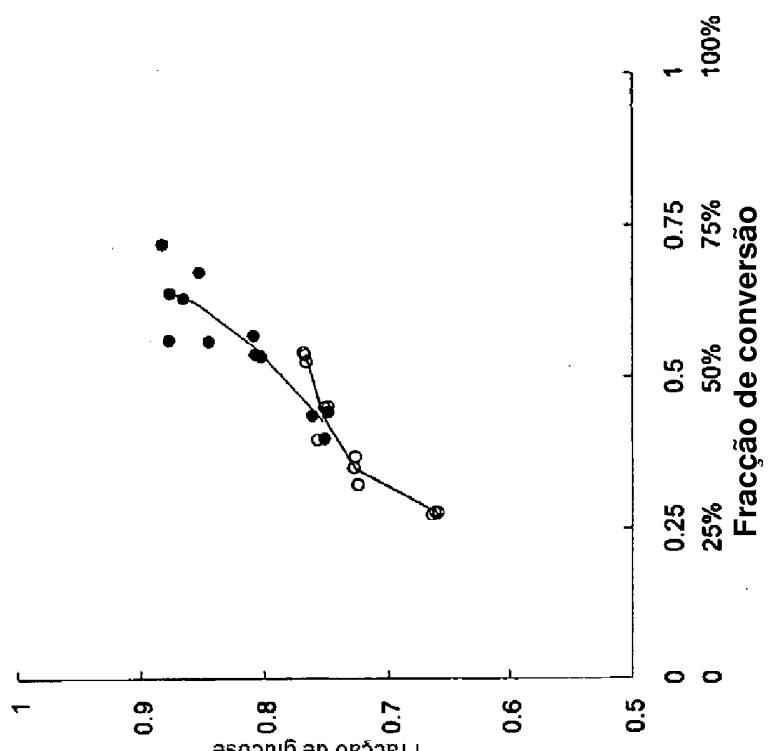


FIG. 7(A)

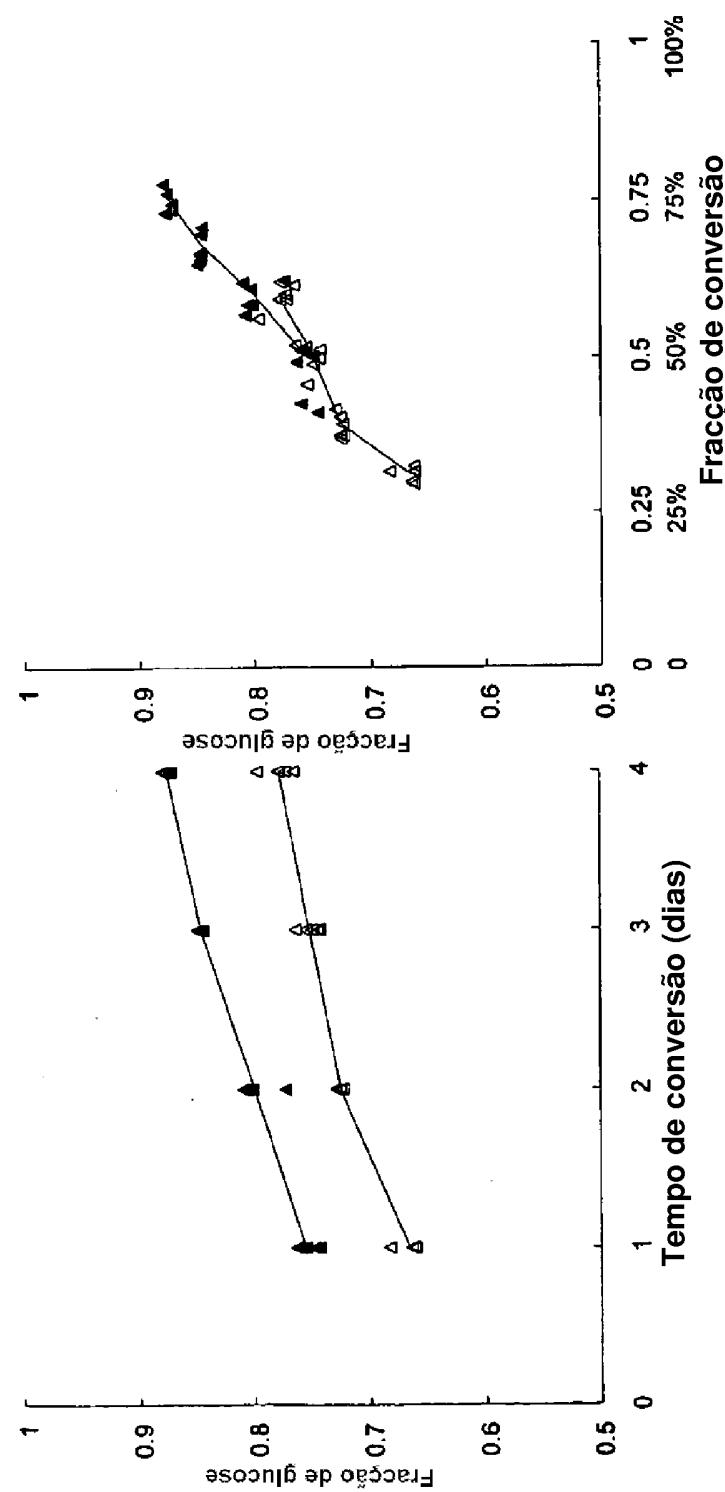


FIG. 7(B)

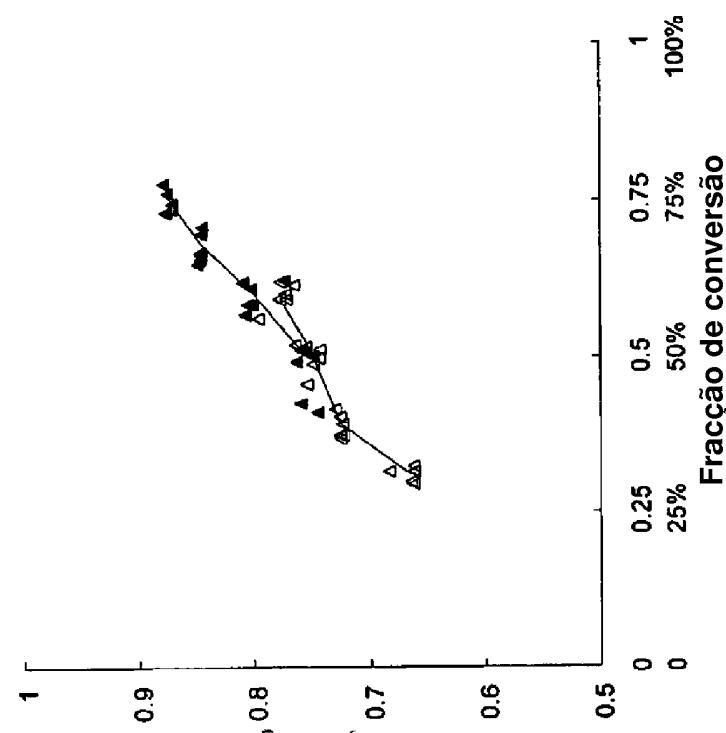


FIG. 8(A)

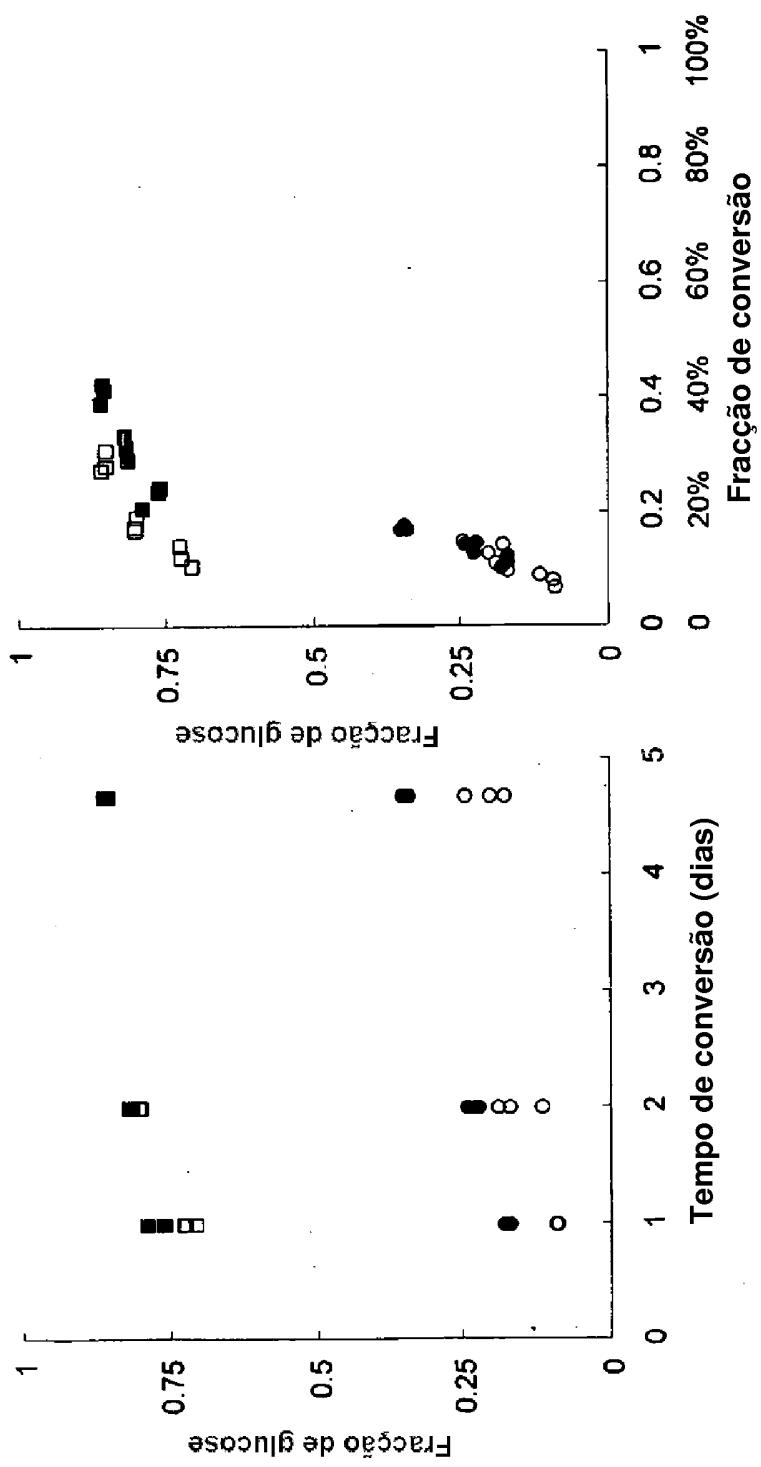


FIG. 9(A)

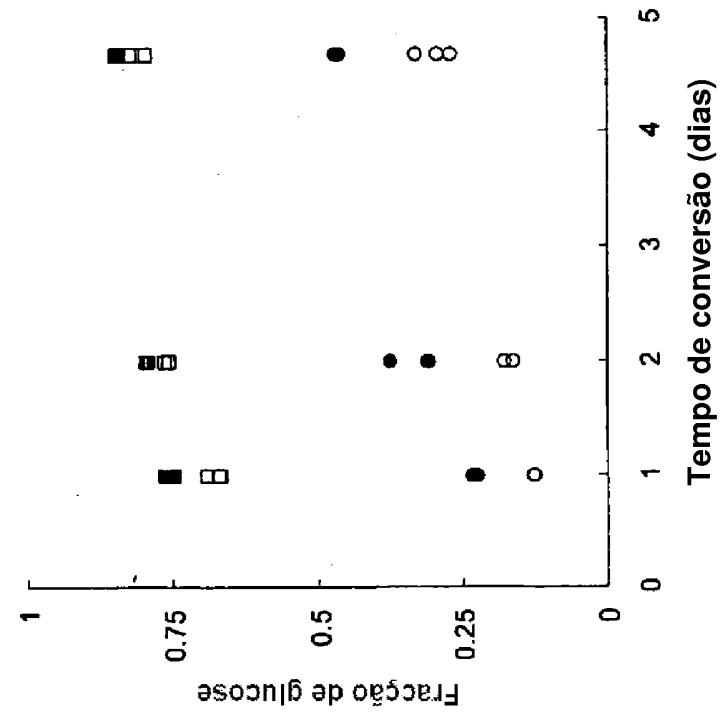


FIG. 9(B)

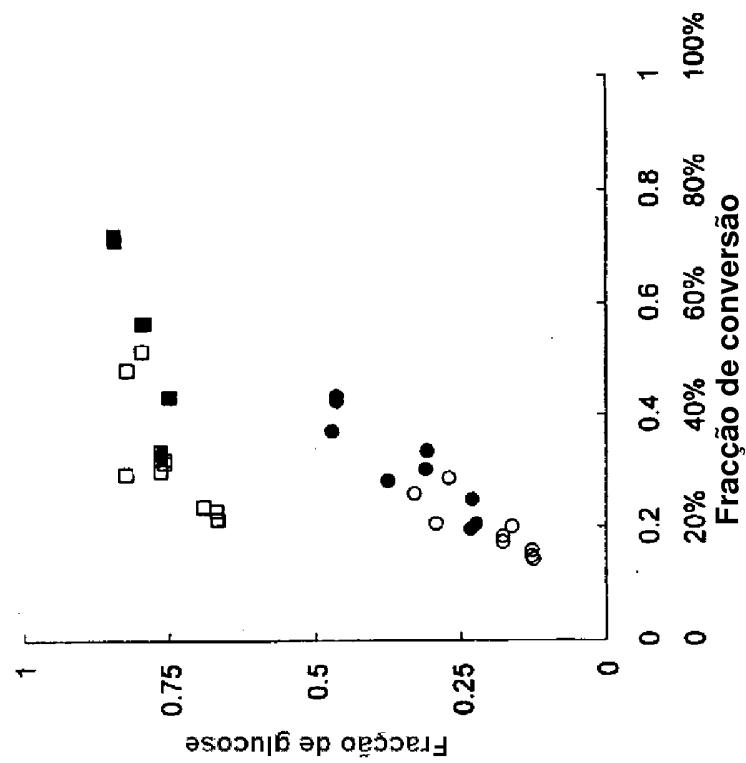


FIG 10(A)

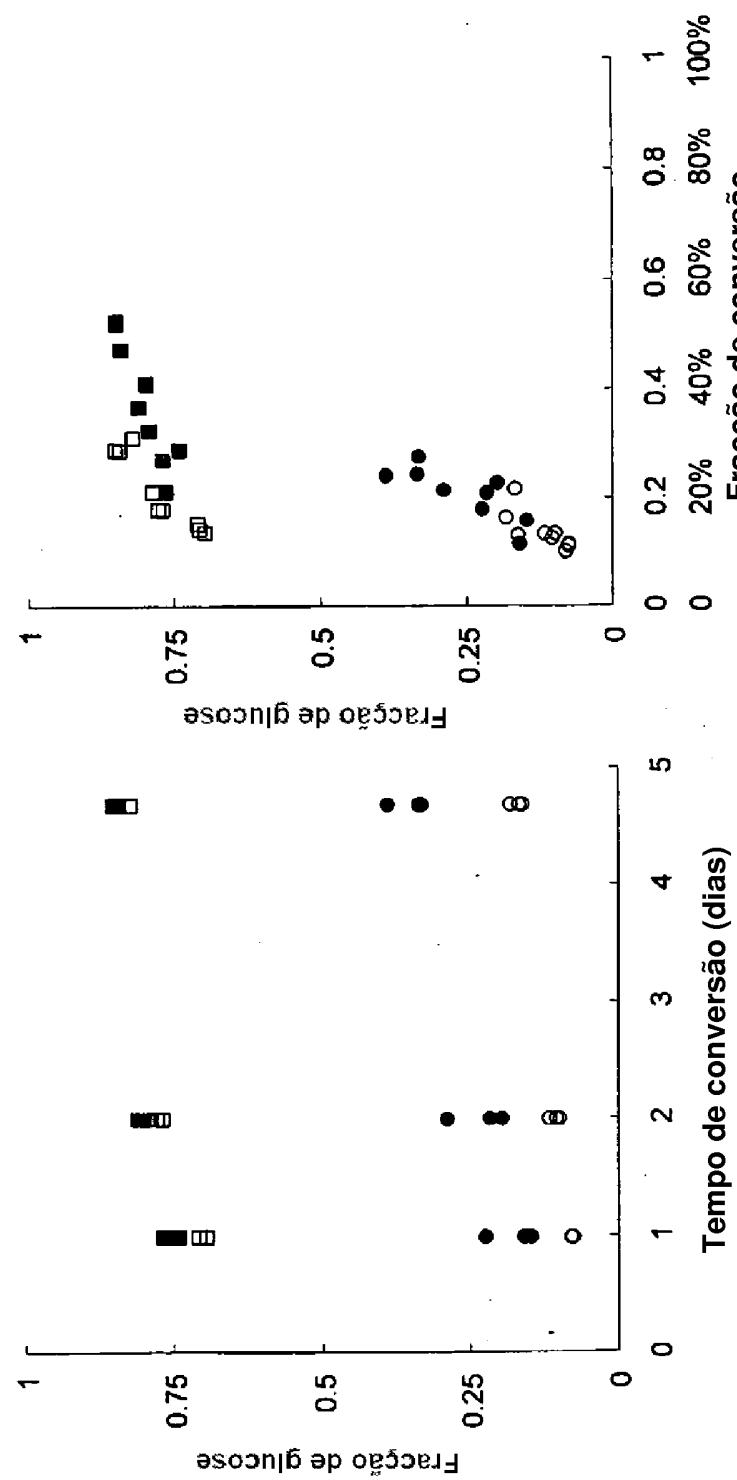


FIG 10(B)

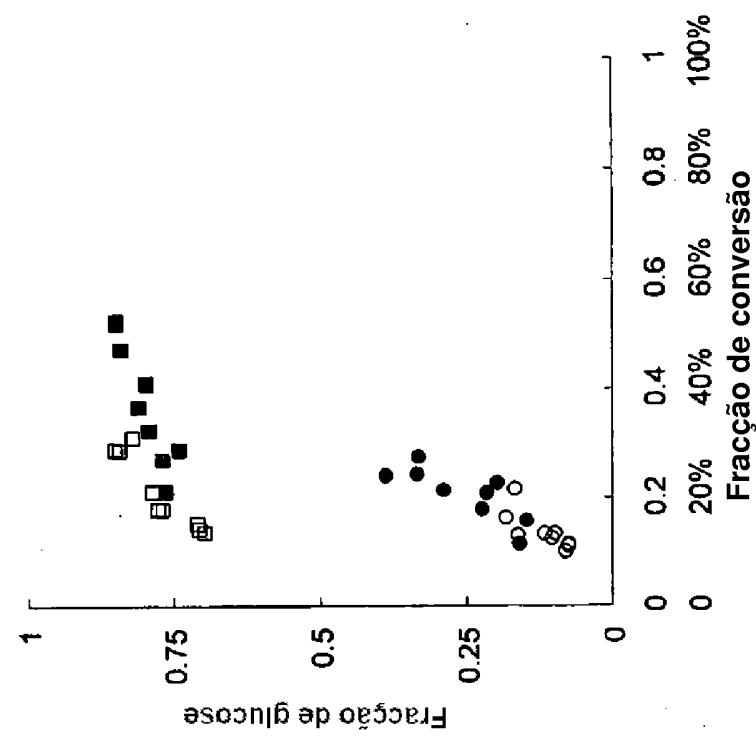


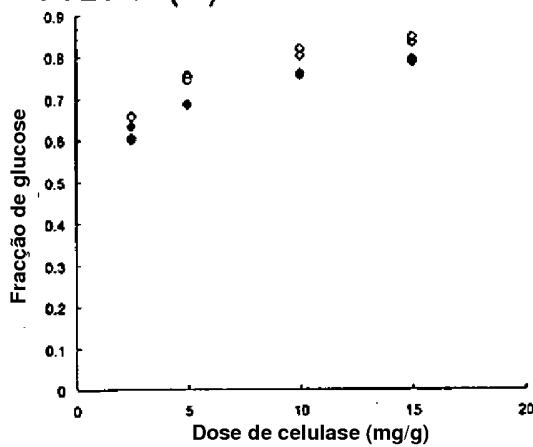
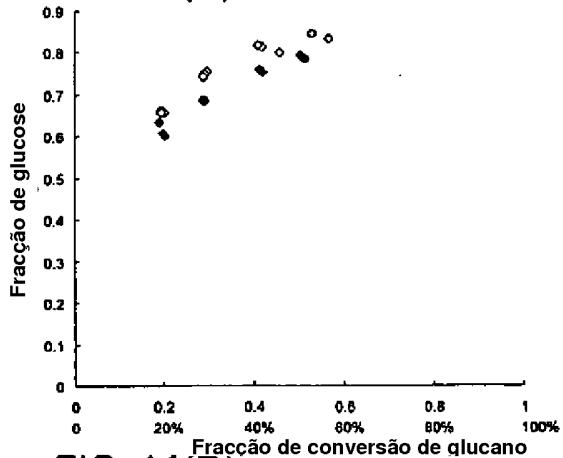
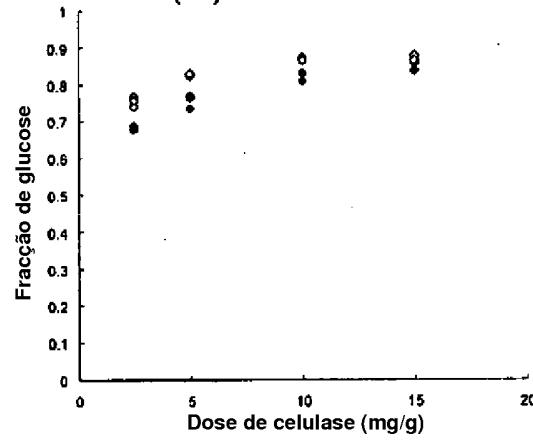
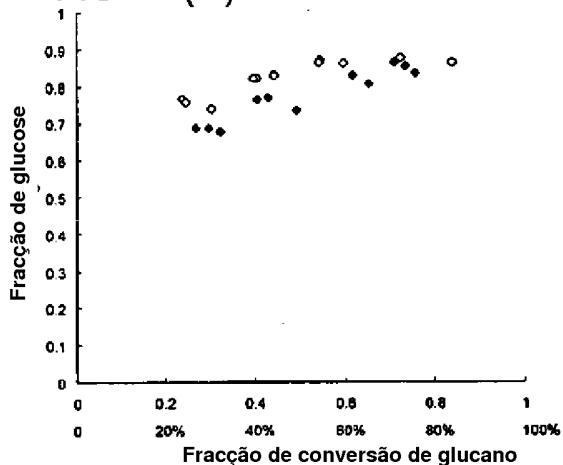
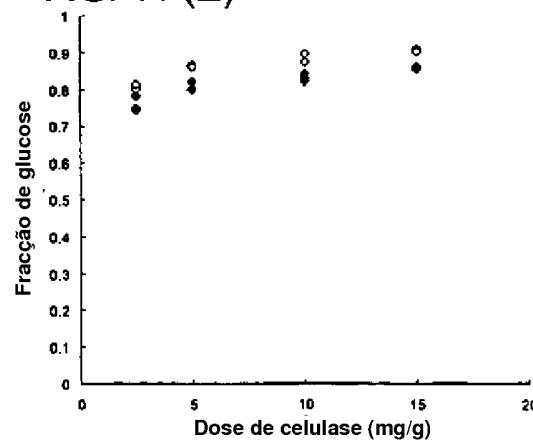
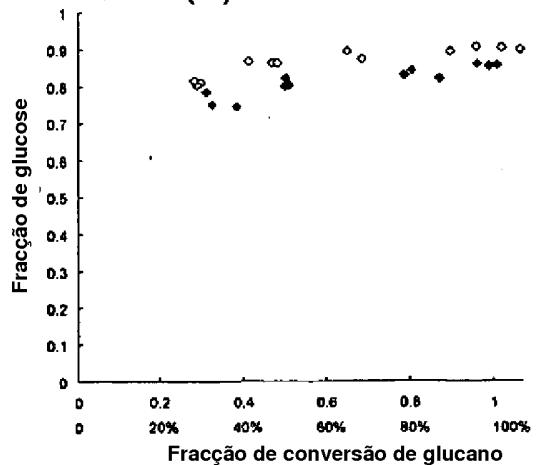
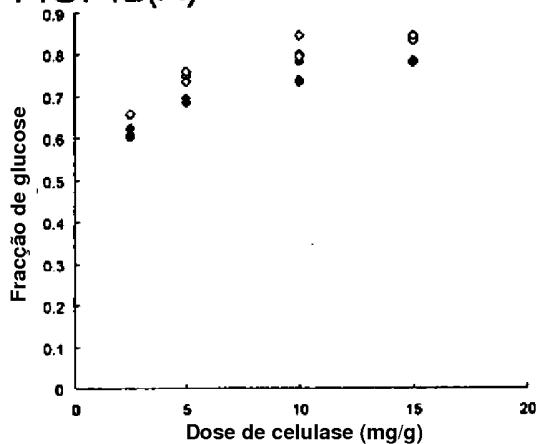
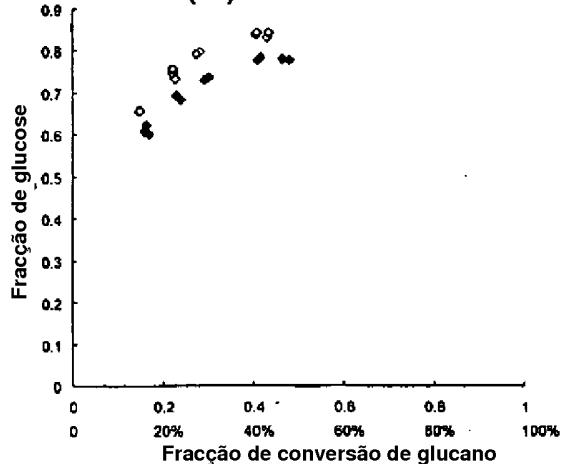
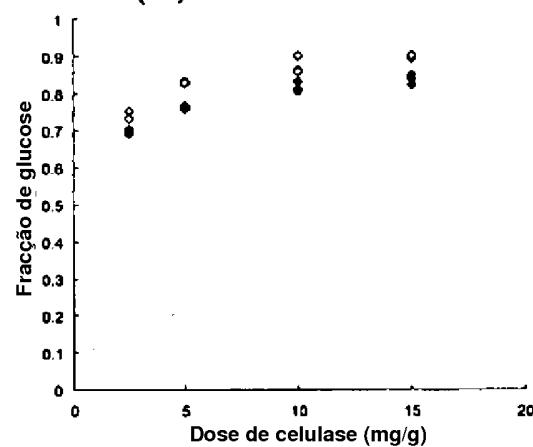
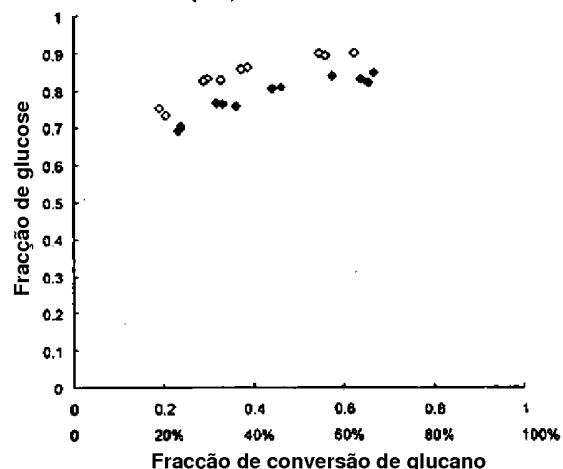
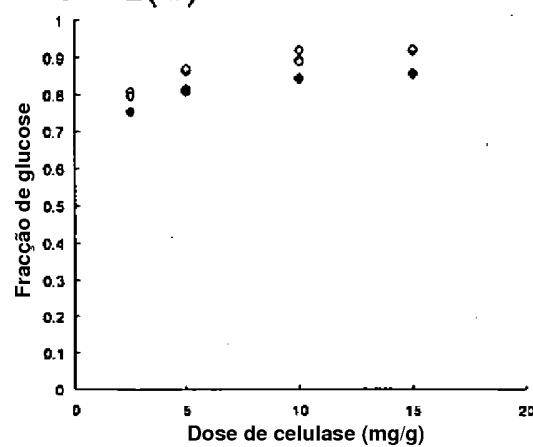
FIG. 11(A)**FIG. 11(B)****FIG. 11(C)****FIG. 11(D)****FIG. 11 (E)****FIG. 11(F)**

FIG. 12(A)**FIG. 12(B)****FIG. 12(C)****FIG. 12(D)****FIG. 12(E)****FIG. 12(F)**