



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

(11) PI 0718641-0 B1



(22) Data do Depósito: 13/11/2007

(45) Data de Concessão: 12/09/2017

(54) Título: MÉTODO PARA CONVERSÃO DE UM MATERIAL CELULÓSICO EM GLICOSE OU CELOBIOSE

(51) Int.Cl.: C12P 19/02; C12P 19/12

(30) Prioridade Unionista: 13/11/2006 US 60/858,579

(73) Titular(es): DANISCO US INC., GENENCOR DIVISION

(72) Inventor(es): BRADLEY KELEMEN; EDMUND A. LARENAS; COLIN MITCHINSON

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA CONVERSÃO DE UM MATERIAL CELULÓSICO EM GLICOSE OU CELOBIOSE".

1. DECLARAÇÃO DOS DIREITOS DA INVENÇÃO FEITA SOB PESQUISA
5 E DESENVOLVIMENTO FEDERALMENTE PATROCINADOS

Porções do presente trabalho foram financiadas pelo Subcontrato Nº ZCQ-0-30017-01 com o National Renewable Energy Laboratory sob o Prime Contract Nº DE-AC36-99GO10337 com o U.S. Department of Energy. Desta maneira, o Governo dos Estados Unidos pode ter certos direitos na
10 invenção.

2. REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

O presente pedido reivindica benefício e prioridade do Pedido Provisório U.S. Nº de Série 60/858.579 intitulado "Method for Improving Yield of Cellulose Conversion Process", depositado em 13 de novembro, 2006,
15 incorporado aqui a título de referência em sua totalidade.

3. CAMPO

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

20 4. ANTECEDENTES

A produção de açúcares a partir de materiais celulósicos é conhecida há algum tempo, como o são as subsequentes fermentação e destilação desses açúcares em etanol. Muito do desenvolvimento da técnica anterior aconteceu perto da Segunda Guerra Mundial quando combustíveis
25 estavam muito valorizados em países tal como Alemanha, Japão e União Soviética. Esses primeiros processos eram principalmente direcionados à hidrólise ácida, mas eram muito complexos em sua engenharia e projeto e eram muito sensíveis a variações pequenas em variáveis de processo, tal como temperatura, pressão e concentrações de ácido. Uma discussão compreensiva desses primeiros processos é apresentada em "Production of Sugars From Wood Using High-Pressure Hydrogen Chloride", *Biotechnology and Bioengineering*, Volume XXV, em 2757-2773 (1983).

O fornecimento abundante de petróleo no período da Segunda Guerra Mundial até os anos 70 deixou mais lenta a pesquisa de conversão de metanol. No entanto, devido à crise do petróleo de 1973, pesquisadores aumentaram seus esforços para desenvolver processos para a utilização de madeira e subprodutos agrícolas para a produção de etanol como uma fonte de energia alternativa. Esta pesquisa foi especialmente importante para desenvolvimento de etanol como um aditivo de gasolina para reduzir a dependência dos Estados Unidos da produção de petróleo estrangeiro, para aumentar a taxa de octano de combustíveis e para reduzir os poluentes de exaustão como uma medida ambiental.

Concomitantemente com a "crise do petróleo", como ficou conhecida, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos promulgou regulamentações requerendo a redução de aditivos de chumbo em um esforço de reduzir a poluição do ar. Na medida em que etanol é virtualmente uma substituição de chumbo, algumas refinarias selecionaram etanol como o substituto, especialmente uma vez que ele pode ser facilmente introduzido na operação de uma refinaria sem investimento de equipamento de capital caro.

Em adição à melhoria dos processos de sacarificação de gás em alta pressão e alta temperatura desenvolvidos décadas atrás, pesquisa atual se direciona principalmente a processos de conversão enzimática. Esses processos empregam enzimas de uma variedade de organismos, tal como fungos, levedura e bactérias mesofílicos e termofílicos, que degradam a celulose em açúcares fermentáveis. Ainda permanece incerteza com esses processos e sua habilidade em ser ampliado para comercialização bem como suas taxas ineficientes de produção de etanol.

Celulose e hemicelulose são os materiais de planta mais abundantes produzidos através de fotossíntese. Elas podem ser degradadas para uso como uma fonte de energia por vários microorganismos, incluindo bactérias, levedura e fungos, que produzem enzimas extracelulares capazes de hidrólise do substrato polimérico em açúcares monoméricos (Aro e outros, 2001). Organismos são frequentemente restritivos com relação a quais açú-

cares eles usam e isto dita quais açúcares são melhor produzidos durante conversão. Conforme os limites de recursos não-renováveis se aproximam, o potencial de celulose em se tornar um recurso de energia renovável principal é enorme (Krishna e outros, 2001). A utilização eficaz de celulose em 5 processos biológicos é uma abordagem para superar o déficit de alimentos, rações e combustíveis (Ohmiya e outros, 1997).

Celulases são enzimas que hidrolisam celulose (ligações beta-1,4-glucagon ou beta D-glicosídicas) resultando na formação de glicose, cellobiose, celooligossacarídeo e similar. Celulases têm sido tradicionalmente 10 divididas em três classes principais: endoglucanases (EC 3.2.1.4) ("EG"), exoglucanase ou cellobioidrolases (EC 3.2.1.91) ("CBH") e beta-glicosidases ([beta]-D-glicosídeo glicoidrolase; EC 3.2.1.21) ("BG"). (Knowles e outros, 1987 e Shulein, 1988). Endoglucanases agem principalmente nas partes 15 amorfas da fibra de celulose, enquanto cellobioidrolases são também capazes de degradar celulose cristalina.

Celulases foram também mostradas ser úteis em degradação de biomassa de celulose em etanol (onde a celulase degrada celulose para glicose e levedura ou outros micróbios fermentam mais a glicose em etanol), no tratamento de polpa mecânico (Pere e outros, 1996), para uso como um 20 aditivo alimentar (WO 91/04673) e em moagem a úmido de grão. Sacariação e fermentação separadas é um processo com o que celulose presente em biomassa, por exemplo, resto de milho, é convertida em glicose e subsequentemente linhagens de levedura convertem glicose em etanol. Sacariações e fermentação simultâneas é um processo com o que celulose 25 presente em biomassa, por exemplo, resto de milho, é convertida em glicose e, ao mesmo tempo e no mesmo reator, linhagens de levedura convertem glicose em etanol. Produção de etanol a partir de fontes prontamente disponíveis de celulose provê uma fonte de combustível renovável, estável.

Celulases são conhecidas ser produzidas por um grande número 30 de bactérias, levedura e fungos. Certos fungos produzem um sistema celulase completo (isto é, uma celulase integral) capaz de degradar formas cristalinas de celulose. A fim de eficientemente converter celulose cristalina em

glicose o sistema de celulase completo compreendendo componentes de cada uma das classificações CBH, EG e BG é requerido, com componentes isolados menos eficazes em hidrólise de celulose cristalina (Filho e outros, 1996). Em particular, a combinação de celulases tipo EG e celulases tipo 5 CBH interage para degradar mais eficientemente celulose do que qualquer enzima usada sozinha (Wood, 1985; Baker e outros, 1994; e Nieves e outros, 1995).

Adicionalmente, celulases são conhecidas na técnica ser úteis no tratamento de têxteis para os propósitos de aumento da habilidade de 10 limpeza de composições detergente, para uso como um agente de amolecimento, para melhora do toque e aparência de tecidos de algodão e similar (Kumar e outros, 1997). Composições detergente contendo celulase com performance de limpeza melhorada (Patente U.S. Nº 4.435.307; Pedidos GB NºS 2.095.275 e 2.094.826) e para uso no tratamento de tecido para melhorar o toque e a aparência do têxtil (Patentes U.S. NºS 5.648.263, 5.691.178 15 e 5.776.757 e Pedido GB Nº 1.358.599) foram descritas.

Então, celulases produzidas em fungos e bactérias têm recebido atenção significante. Em particular, fermentação de *Trichoderma spp.* (por exemplo, *Trichoderma longibrachiatum* ou *Trichoderma reesei*) foi mostrada 20 produzir um sistema de celulase completo capaz de degradar formas cristalinas de celulose. Com os anos, produção de *Trichoderma cellulase* tem sido melhorada através de mutagênese, avaliação, seleção e desenvolvimento clássicos de condições de fermentação econômicas de grande escala, altamente refinadas. Embora o sistema de celulase multicomponente de *Trichoderma spp.* seja capaz de hidrolisar celulose em glicose, há celulases de outros microorganismos, em particular linhagens bacterianas, com propriedades diferentes para hidrólise de celulose eficiente, e seria vantajoso expressar essas proteínas em um fungo filamentoso para produção de celulase 25 em escala industrial. No entanto, os resultados de muitos estudos demonstram que o rendimento de enzimas bacterianas a partir de fungos filamentosos é baixo (Jeeves e outros, 1991).

Açúcares solúveis, tal como glicose e celobiose, têm uma multi-

plicidade de usos em indústria para a produção de agentes químicos e produtos biológicos. A otimização de hidrólise de celulose permite o uso de quantidades menores de enzima e eficácia de custo aperfeiçoada para a produção de açúcares solúveis. Apesar do desenvolvimento de várias abordagens, permanece a necessidade na técnica de melhora do rendimento de açúcares solúveis obtidos a partir de materiais celulósicos.

5. SUMÁRIO

Os presentes ensinamentos proveem métodos para aumento do rendimento de açúcares solúveis a partir da sacarificação enzimática de materiais de partida celulósicos através da incubação de um substrato celulósico ou um substrato celulósico pré-tratado com uma celulase em uma temperatura na ou por volta da temperatura de desnaturação térmica da celulase. Os presentes ensinamentos também proveem métodos para aumento do rendimento de glicose a partir da sacarificação enzimática de materiais de partida celulósicos através da incubação de substrato celulósico ou um substrato celulósico pré-tratado com uma celulase em uma temperatura na ou por volta da temperatura de desnaturação térmica da celulase.

São também providos métodos para conversão de um material celulósico em glicose através da combinação de um material celulósico com uma celulase incubando a combinação de material celulósico e celulase em uma temperatura maior do que cerca de 38°C para causar uma reação de hidrólise para converter pelo menos 20% do dito material celulósico em açúcares solúveis, onde a fração de glicose é pelo menos 0,75 com relação aos açúcares solúveis. O presente ensinamento também provê métodos para conversão de um material celulósico em celobiose através da combinação de um material celulósico com mistura de enzima compreendendo uma endoglucanase 1, incubação da combinação de material celulósico e celulase causa uma reação de hidrólise para converter até 50% do material celulósico em açúcares solúveis, onde fração de glicose é menos do que cerca de 0,5 com relação aos ditos açúcares solúveis.

As celulases podem ser celulases integrais, misturas de celulases ou combinações das mesmas produzidas por microorganismos dos gê-

neros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Neurospora* ou formas sexuais alternativas dos mesmos tal como *Emericella* e *Hypocrease* (vide Kuhls e outros, 1996). De preferência, espécies tal como *Acidothermus cellulolyticus*, *Thermobifida fusca*, *Humicola grisea* e

5 *Trichoderma reesei* podem ser usadas.

Essas e outras características dos presentes ensinamentos são providas aqui.

6. BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O versado na técnica vai compreender que os desenhos são

10 para propósitos de ilustração apenas e não pretendem limitar o escopo dos presentes ensinamentos de modo algum.

As figuras 1A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 3,3 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase, a 38°C

15 (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados).

As FIGURAS 2A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 12 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase, a 38°C

(símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados).

20 As figuras 3A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 18 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase 1, 38°C

(símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados).

25 As figuras 4A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 20 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase, a 38°C

(símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados).

30 As figuras 5A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 20 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase, a 38°C

(símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados).

As figuras 6A-B mostram a conversão de resto de milho tratado

com ácido diluído em açúcares solúveis através de 12 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei*, a 38°C (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados).

As figuras 7A-B mostram a conversão de resto de milho tratado
5 com ácido diluído em açúcares solúveis através de 12 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* expressando a proteína de fusão CBH1-E1, a 38°C (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados).

As figuras 8A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 15 mg/g de mistura de
10 uma enzima ou de EG1 e CBH1 de *T. reesei* (quadrados) ou E1 e CBH1 de *H. grisea* (círculos) a 38°C (símbolos abertos) e 65°C (símbolos fechados).

As figuras 9A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 15 mg/g de mistura de uma enzima ou de EG1, CBH1 de *T. reesei* e CBH2 de *T. reesei* (quadrados) ou E1, CBH1 de *H. grisea* e CBH2 de *T. reesei* (círculos) a 38°C (símbolos abertos) e 65°C (símbolos fechados).

As figuras 10A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 15 mg/g de mistura de uma enzima ou de EG1, CBH1 de *T. reesei* (quadrados) e E3 ou E1 de *T. fusca*, CBH1 de *H. grisea* e E3 de *T. fusca* (círculos) a 38°C (símbolos abertos) e 65°C (símbolos fechados).

As Figuras 11A-F mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de uma linhagem de *Trichoderma reesei* a 53°C (símbolos fechados) e 59°C (símbolos abertos).

25 Figuras 12A-F. A conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de uma celulase integral de *Trichoderma reesei* expressando uma proteína de fusão CBH1-E1, a 53°C (símbolos fechados) e 59°C (símbolos abertos).

7. DESCRIÇÃO DETAILEDADA DE VÁRIAS MODALIDADES

30 A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como geralmente compreendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica à qual a presente

invenção pertence. Singleton e outros, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2^a ED., John Wiley and Sons, Nova York (1994) e Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, N.Y. (1991) proveem um versado na técnica com 5 um dicionário geral de muitos dos termos usados na presente invenção. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são descritos. Faixas numéricas são inclusivas dos números definindo a faixa. Deve ser compreendido que a presente 10 invenção não é limitada à metodologia, protocolos e reagentes particulares descritos, uma vez que esses podem variar.

Os cabeçalhos providos aqui não são limitações dos vários aspectos ou modalidades da invenção que podem ser logrados por referência ao relatório como um todo. Deste modo, os termos definidos imediatamente 15 abaixo são mais integralmente definidos com referência ao relatório como um todo.

O termo "celulase" refere-se a uma categoria de enzimas capazes de hidrólise de polímeros de celulose (ligações beta-1,4-glicano ou beta D-glicosídicas) em oligômeros de celo-oligossacarídeo mais curtos, celobiose e/ou glicose. 20

O termo "exo-cellobiodrolase" (CBH) refere-se a um grupo de enzimas celulase classificadas como EC 3.2.1.91. Essas enzimas são também conhecidas como exoglucanases ou cellobiodrolases. Enzimas CBH hidrolisam celobiose da extremidade de redução ou não-redução de celulose. Em geral, uma enzima do tipo CBHI de preferência hidrolisa celobiose da extremidade de redução de celulose e uma enzima tipo CBHII de preferência hidrolisa a extremidade de não-redução de celulose. 25

O termo "atividade de cellobiodrolase" é definido aqui como uma atividade de 1,4-D-glicano cellobiodrolase (E.C. 3.2.1.91) que catalisa a hidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas em celulose, celotetriose ou qualquer polímero contendo glicose beta-1,4-ligada, liberação de celobiose das extremidades da cadeia. Para propósitos da presente invenção, atividade de 30

celobioiodrolase pode ser determinada através da liberação de açúcar de redução solúvel em água de uma celulose conforme medido através do método PHBAH de Lever e outros, 1972, *Anal. Biochem.* 47:273-279. Uma distinção entre o modo de ataque de exoglucanase de uma celobioiodrolase e o modo de ataque de endoglucanase pode ser feita através de uma medição similar de liberação de açúcar de redução de celulose substituída tal como carboximetilcelulose ou hidroxietil celulose (Ghose, 1987, *Pure & Appl. Chem.* 59:257-268). Uma celobioiodrolase verdadeira terá uma razão muito alta de atividade em celulose não-substituída versus substituída (Bailey e outros, 1993, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17:65-76).

O termo "endoglucanase" (EG) refere-se a um grupo de enzimas celulases classificado como EC 3.2.14. Uma enzima EG hidrolisa ligações beta-1,4-glicosídicas internas da celulose. O termo "endoglucanase" é definido aqui como uma endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glicano 4-glicanoidrolase (E.C. Nº 3.2.1.4) que catalisa endoídrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas em celulose, derivados de celulose (por exemplo, carboxi metil celulose, liquenina, ligações beta-1,4 em beta-1,3 glicanos mistos tal como beta-D-glicanos ou xiloglicanos de cereal e outro material de planta contendo componentes celulósicos. Para propósitos da presente invenção, atividade de endoglucanase pode ser determinada usando hidrólise de carboximetil celulose (CMC) de acordo com o procedimento de Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59:257-268.

O termo "beta-glicosidase" é definido aqui como uma glicoidrolase de beta-D-glicosídeo (E.C. 3.2.1.21) que catalisa a hidrólise de celobiose com a liberação de beta-D-glicose. Para propósitos da presente invenção, atividade de beta-glicosidase pode ser medida através de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, HPLC.

"Atividade celulolítica" compreende atividade de exoglucanase, atividade de endoglucanase ou ambos os tipos de atividade de enzima, bem como atividade de beta-glicosidase.

Muitos micróbios produzem enzimas que hidrolisam celulose, incluindo as bactérias *Acidothermus*, *Thermobifida*, *Bacillus* e *Cellulomonas*;

Streptomyces, levedura tal como uma *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* ou *Yarrowia* e fungos *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chrysosporium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyphocladium* ou *Trichoderma*, ou formas sexuais alternativas dos mesmos tal como *Emericella* e *Hypocrea* (Vide Kuhls e outros, 1996).

Uma composição de "ocorrência não-natural" compreende aquelas composições produzidas através de: (1) combinação de enzimas celulolíticas componentes ou em uma razão de ocorrência natural ou de ocorrência não-natural, isto é, razão alterada; ou (2) modificação de um organismo para superexpressar ou subexpressar uma ou mais enzima celulolíticas; ou (3) modificação de um organismo de modo que pelo menos uma enzima celulolítica seja deletada ou (4) modificação de um organismo para expressar uma enzima celulolítica componente heteróloga. As enzimas celulolíticas componentes podem ser providas como polipeptídios isolados antes da combinação para formar a composição de ocorrência não-natural.

Foi constatado, em parte, que temperatura de sacarificação alta ambos aumenta o rendimento de glicose de materiais celulósicos e também resulta em conversão geral aperfeiçoada de celulose de modo que a fração de glicose no produto de conversão é aumentada em temperaturas de incubação maiores.

Os presentes ensinamentos proveem métodos para aumento do rendimento de açúcares solúveis a partir da sacarificação enzimática de materiais de partida celulósicos através da incubação de um substrato celulósico ou um substrato celulósico pré-tratado com uma celulase em uma temperatura na ou acima da temperatura de desnaturação térmica da celulase. Os presentes ensinamentos proveem ainda métodos para aumento do rendimento de glicose a partir da sacarificação enzimática de materiais de partida celulósicos através da incubação de um substrato celulósico ou um substrato celulósico pré-tratado com uma celulase em uma temperatura na ou acima

da temperatura de desnaturação térmica da celulase.

Nos métodos da presente descrição, o material celulósico pode ser qualquer material contendo celulose. O material celulósico pode incluir, mas não é limitado a, celulose, hemicelulose e materiais lignocelulósicos.

- 5 Em algumas modalidades, os materiais celulósicos incluem, mas não estão limitados a, biomassa, material herbáceo, resíduos agrícolas, resíduos florestais, esgoto sólido, papel de refugo e resíduos de polpa e papel. Em algumas modalidades, o material celulósico inclui madeira, polpa de madeira, lama de fabricação de papel, correntes de refugo de polpa de papel, tábua compacta, resto de milho, fibra de milho, arroz, refugo de processamento de papel e polpa, plantas de madeira e herbáceas, polpa de fruta, polpa vegetal, pedra-pomes, grãos de destiladores, gramas, cascas de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, algodão, juta, cânhamo, linho, bambu, sisal, abacá, palha, sabugos de milho, grãos de destiladores, folhas, palha de trigo, palha de coco, algas, grama *switchgrass* e misturas dos mesmos (vide, por exemplo, Wiselogel e outros, 1995, em *Handbook on Bioethanol* (Charles, E. Wyman, editor), pp. 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 e outros, 1999, *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, em *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, T. Schepel, managing editor, Volume 65, pp. 23-40, Springer-Verlag, Nova Iorque).
- 10
- 15
- 20
- 25

O material celulósico pode ser usado como é ou pode ser submetido a pré-tratamento usando métodos conhecidos na técnica. Tais pré-tratamentos incluem pré-tratamentos químico, físico e biológico. Por exemplo, técnicas de pré-tratamento físico podem incluir, sem limitação, vários tipos de moagem, trituração, explosão fumegante/com vapor, irradiação e hidrotermólise. Técnicas de pré-tratamento químico podem incluir sem limitação ácido diluído, alcalina, solvente orgânico, amônia, dióxido de enxofre, dióxido de carbono e hidrotermólise de pH controlado. Técnicas de pré-tratamento biológico podem incluir sem limitação aplicação de microorganismos de solubilização de lignina. O pré-tratamento pode acontecer de vá-

30

rios minutos a várias horas, tal como de a partir de cerca de 1 hora a cerca de 120.

Em uma modalidade, o pré-tratamento pode ser através de temperatura elevada e a adição ou de ácido diluído, ácido concentrado ou solução alcalina diluída. A solução de pré-tratamento pode ser adicionada por um tempo suficiente para pelo menos parcialmente hidrolisar os componentes de hemicelulose e então neutralizada.

Em algumas modalidades, o pré-tratamento é selecionado de um grupo consistindo em explosão com vapor, esmagamento, moagem, hidrólise ácida e combinações dos mesmos.

A celulase é reagida com o material celulósico em cerca de 25°C, cerca de 30°C, cerca de 35°C, cerca de 40°C, cerca de 45°C, cerca de 50°C, cerca de 55°C, cerca de 60°C, cerca de 65°C, cerca de 70°C, cerca de 75°C, cerca de 80°C, cerca de 85°C, cerca de 90°C, cerca de 95°C, cerca de 100°C. Em algumas modalidades as enzimas são reagidas com substrato na ou mais ou menos na temperatura de desnaturação térmica da celulase. O pH pode variar de a partir de 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 a cerca de pH 8,5. Em geral, a faixa de pH será de a partir de cerca de pH 4,5 a cerca de pH 9. Incubação da celulase sob essas condições resulta em liberação de quantidades substanciais do açúcar solúvel a partir do material celulósico. Por quantidade substancial entende-se pelo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais de açúcar solúvel sendo açúcar disponível.

O tratamento com celulase pode acontecer a partir de vários minutos a várias horas, tal como de a partir de cerca de 0,1 hora a cerca de 120 horas, de preferência cerca de 120 horas a cerca de 72 horas, com mais preferência cerca de 24 horas a 48 horas.

A quantidade de celulase é uma função da(s) enzima(s) aplicada(s) e do tempo de reação e condições dados. De preferência, a(s) celulase(s) podem ser dosadas em uma quantidade total de a partir de cerca de 2 - 40 mg/g de material celulósico.

Nos métodos da presente descrição, a celulase pode ser celulase integral, uma celulase integral suplementada com uma ou mais atividades de enzima e misturas de celulase. Em algumas modalidades, a celulase pode ser uma preparação de celulase integral. Conforme aqui usado, a expressão "preparação de celulase integral" refere-se a composições contendo ambas as celulases de ocorrência natural e de ocorrência não-natural. Uma composição de "ocorrência natural" é uma produzida por uma fonte de ocorrência natural e que compreende um ou mais componentes tipo celobioidrolase, um ou mais tipo endoglucanase e um ou mais beta-glicosidase onde cada um desses componentes é encontrado na razão produzida pela fonte. Uma composição de ocorrência natural é uma que é produzida por um organismo não-modificado com relação a enzimas celulolíticas de modo que a razão das enzimas componentes é inalterada daquelas produzidas pelo organismo nativo.

Em geral, as celulases podem incluir, mas não estão limitadas a:

- (i) endoglucanases (EG) ou 1,4- β -d-glicano-4-glicanoidrolases (EC 3.2.1.4),
- (ii) exoglicanases, incluindo 1,4- β -d-glicano glicanoidrolases (também conhecidas como celodextrinases) (EC 3.2.1.74) e 1,4- β -d-glicano celobioidrolases (exo-celobioidrolases, CBH) (EC 3.2.1.91) e (iii) β -glicosidase (BG) ou β -glicosídeo glicoidrolases (EC 3.2.1.21).

Na presente descrição, a celulase pode ser de qualquer micro-organismo que seja útil para a hidrólise de um material celulósico. Em algumas modalidades, a celulase é uma celulase integral de fungos filamentosos. "Fungos filamentosos" incluem todas as formas filamentosas da subdivisão *Eumycota* e *Oomycota*.

Em algumas modalidades, a celulase é uma espécie *Acrmonium*, *Aspergillus*, *Emericella*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Scytalidium*, *Thiavelia*, *Tolypocladium* ou *Trichoderma*, celulase integral.

Em algumas modalidades, a celulase é uma celulase integral de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulan*, *Aspergillus niger* ou *Aspergillus oryzae*. Em

outro aspecto, celulase é uma celulase integral de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulósum*, *Fusarium trichothecioides* ou *Fusarium venenatum*. Em outro aspecto, a celulase é uma celulase integral de *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Scytalidium thermophilum* ou *Thielavia terrestris*. Em outro aspecto, a celulase é uma *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, por exemplo, RL-P37 (Sheir-Neiss e outros, *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 20 (1984) pp. 46-53; Montenecourt, B.S., Can., 1-20, 1987), QM9414 (ATCC Nº 26921), NRRL 15709, ATCC 13631, 56764, 56466, 56767 ou *Trichoderma viride*, por exemplo, ATCC 32098 e 32086, celulase integral.

Em algumas modalidades, a celulase é uma celulase integral RutC30 de *Trichoderma reesei*, que está disponível da American Type Culture Collection como *Trichoderma reesei* ATCC 56765.

Na presente descrição, a células pode ser de qualquer método de cultivo de microorganismo conhecido na técnica resultando na expressão de enzimas capazes de hidrólise de um material celulósico. Fermentação pode incluir cultivo em frasco agitado, fermentação em pequena ou grande escala, tal como contínua, em batelada ou *fed-batch*, ou fermentações em estado sólido em laboratório ou fermentadores industriais realizados em um meio adequado e sob condições que permitem que a celulase seja expressa ou isolada.

Em geral, o microorganismo é cultivado em um meio de cultura celular adequado para produção de enzimas capazes de hidrólise de um material celulósico. O cultivo acontece em um meio nutritivo adequado compreendendo fontes de carbono e nitrogênio e sais inorgânicos, usando procedimentos conhecidos na literatura. Meios de cultura, faixas de temperatura e outras condições adequadas para crescimento e produção de celulase

são conhecidos na técnica. Como um exemplo não-limitante, a faixa de temperatura normal para a produção de celulases através de *Trichoderma reesei* é 24°C a 28°C.

Certos fungos produzem sistemas de celulase complexo que 5 incluem exo-celobiodrolases ou celulases tipo CBH, endoglucanases ou celulases tipo EG e beta-glicosidases ou celulares tipo BG (Schulein, 1988). No entanto, algumas vezes esses sistemas não têm celulases tipo CBH, por exemplo, celulases bacterianas também tipicamente incluem poucas ou quaisquer celulases tipo CBH. Ainda, foi mostrado que os componentes EG 10 e os componentes CBH interagem sinergisticamente para mais eficientemente degradar celulose. Vide, por exemplo, Wood, 1985. Os componentes diferentes, isto é, as várias endoglucanases e as várias exocelobiodrolases em um sistema de celulase multicomponente ou completo geralmente têm propriedades diferentes, tal como ponto isoelétrico, peso molecular, grau de 15 glicosilação, especificidade de substrato e padrões de ação enzimática.

Em algumas modalidades, a celulase é usada como é produzida através de fermentação sem nenhuma ou com mínima recuperação e/ou purificação. Por exemplo, uma vez celulases sendo secretadas por uma célula no meio de cultura celular, o meio de cultura celular contendo as celulases pode ser usado. Em algumas modalidades, a preparação de celulase integral compreende os teores não-fracionados de material de fermentação, incluindo meio de cultura celular, enzimas extracelulares e células. Alternativamente, a preparação de celulase integral pode ser processada através de qualquer método convencional, por exemplo, através de precipitação, centrifugação, afinidade, filtragem ou qualquer outro método conhecido na técnica. 20 Em algumas modalidades, a preparação de celulase integral pode ser concentrada, por exemplo, e então usada sem purificação adicional. Em algumas modalidades a preparação de celulase integral compreende agentes químicos que diminuem a viabilidade celular ou matam as células. Em algumas modalidades, as células são lisadas ou permeabilizadas usando métodos 25 conhecidos na técnica.

Uma celulase contendo uma quantidade grande de celobiodro-

lase e/ou beta-glicosidase encontra utilidade em produção de etanol. Etanol deste processo pode ser usado mais como um aumentador de octano ou diretamente como um combustível no lugar de gasolina que é vantajoso porque o etanol como uma fonte de combustível é mais ambientalmente amigável do que produtos derivados do petróleo. É conhecido que o uso de etanol vai melhorar a qualidade do ar e possivelmente reduzir os níveis de ozônio e poluição locais. Além disso, utilização de etanol no lugar de gasolina pode ser de importância estratégica em abrandar o impacto de mudanças repentinhas em suprimentos de energia não-renovável e petroquímicos.

Etanol pode ser produzido através de processos de sacarificação e fermentação a partir de biomassa celulósica tal como árvores, plantas herbáceas, esgoto público e resíduos agrícolas e florestais. No entanto, a razão de enzimas celulases individuais dentro de uma mistura de celulase de ocorrência natural produzida por um micrório pode não ser a mais eficiente para conversão rápida de celulose em biomassa em glicose. É conhecido que endoglucanases agem para produzir novas extremidades de cadeia de celulose que são em si substratos para a ação de celobioidrolases e então melhoram a eficiência de hidrólise por todo o sistema de celulase integral. Deste modo, o uso de atividade de celobioidrolase alta ou otimizada pode melhorar muito a produção de etanol.

Etanol pode ser produzido através de degradação enzimática de biomassa e conversão dos sacarídeos liberados em etanol. Este tipo de etanol é frequentemente referido como bioetanol ou biocombustível. Ele pode ser usado como um aditivo ou extensor de combustível em misturas de menos do que 1% e até 100% (um substituto de combustível).

Conversão de celulose grande pode ser conseguida em temperaturas maiores usando os polipeptídios CBH descritos, por exemplo, em uma das Publicações de Patente US US20050054039, US20050037459, US20060205042, US20050048619A1 e US20060218671. Métodos de superexpressão de beta-glicosidase são conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, US 6.022.725. Vide também, por exemplo, US20050214920.

Em algumas modalidades, a celulase é uma proteína de fusão

de exo-cellobiosidrolase, exemplos adequados incluem CBH1 e endoglucanase de *Acidothermus cellulolyticus* ou endoglucanase de *Thermobifida fusca*, CBH1 e endoglucanase *Acidothermus cellulolyticus* e particularmente uma endoglucanase de *Acidothermus cellulolyticus* E1 ou GH74 (vide, por exemplo, Publicação de Patente US Nº 20060057672).

Em algumas modalidades, a mistura de celulase compreende uma celulase selecionada de Endoglucanase de *Trichoderma reesei* (EG1), cellobiosidrolase de *Trichoderma reesei* 1 (CBH1) e cellobiosidrolase de *Trichoderma reesei* (CBH2), cellobiosidrolase de *Humicola grisea* (CBH1) e endoglucanase de *Acidothermus cellulolyticus* E1 (E1), exocelulase de *Thermomonospora fusca* E3 e combinações dos mesmos.

Os métodos da presente invenção podem ser usados na produção de monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos como agentes químicos, matérias-primas de fermentação para microorganismo e indutores para a produção de proteínas, produtos orgânicos, agentes químicos e combustíveis, plásticos e outros produtos ou intermediários. Em particular, o valor de resíduos de processamento (grão de destiladores secos, grãos gastos de fermentação, bagaço da cana-de-açúcar, etc) pode ser aumentado através de solubilização parcial ou completa de celulose ou hemicelulose. Em adição a etanol, alguns agentes químicos que podem ser produzidos a partir de celulose e hemicelulose incluem acetona, acetato, glicina, lisina, ácidos orgânicos (por exemplo, ácido láctico), 1,3-propanodiol, butanodiol, glicerol, etileno glicol, furfural, polidroxialcanoatos, ácido *cis*, *cis*-mucônico, ração animal e xilose.

O presente ensinamento provê ainda métodos para conversão de um material celulósico em glicose compreendendo combinar um material celulósico com uma celulase, incubação da dita combinação de material celulósico e celulase, causar uma reação de hidrólise para converter material celulósico em açúcares solúveis, onde os ditos açúcares solúveis compreendem glicose e cellobiose e a fração de glicose é pelo menos 0,75 com relação aos ditos açúcares solúveis.

O presente ensinamento provê ainda métodos para conversão

de um material celulósico em celobiose compreendendo combinar um material celulósico com uma mistura de celulase compreendendo uma endoglucanase 1. Em algumas modalidades, a endoglucanase 1 pode compreender uma endoglucanase de *Acidothermus cellulolyticus*, incluindo aquelas descritas nas Pat. U.S. NºS 5.536.655 e 6.013.860 e Publicações de Pedido de Patente NºS 2003/0109011, 2006/0026715, 20060057672.

5 Em algumas modalidades, os métodos da presente descrição compreendem ainda a etapa de determinação da quantidade de glicose ou açúcares solúveis.

10 São também providos métodos de conversão de um material celulósico em glicose compreendendo as etapas de combinar um material celulósico com uma celulase de modo que a combinação resultante de material celulósico e celulase tem 1% a cerca de 30% de celulose em peso; e incubação da dita combinação de material celulósico e celulase em uma 15 temperatura maior do que cerca de 38°C a cerca de 100°C por cerca de 0,1 hora a cerca de 96 horas em um pH de a partir de cerca de 4 a cerca de 9 causa uma reação de hidrólise para converter pelo menos 20% do dito material celulósico em açúcares solúveis, onde os ditos açúcares solúveis compreendem glicose e celobiose, e a fração de glicose é pelo menos 0,75 com 20 relação aos ditos açúcares solúveis.

São providos aqui métodos de conversão de um material celulósico em celobiose compreendendo as etapas de combinação de um material celulósico com uma mistura de celulase compreendendo uma endoglucanase 1 de modo que a combinação resultante de material celulósico e mistura 25 de celulase tem 1% a cerca de 30% de celulose em peso; e incubação da dita combinação de material celulósico e celulase em uma temperatura de menos do que cerca de 100°C a cerca de 25°C por cerca de 0,1 hora a cerca de 96 horas em um pH de a partir de cerca de 4 a cerca de 9 para causar uma reação de hidrólise para converter até 50% do dito material celulósico 30 em açúcares solúveis, onde os ditos açúcares solúveis compreendem glicose e celobiose e a fração de glicose é menos do que cerca de 0,5 com relação aos ditos açúcares solúveis.

A presente invenção é descrita em mais detalhes nos exemplos que seguem que não pretendem de modo algum limitar o escopo da invenção conforme reivindicado. As Figuras anexas pretendem ser consideradas como partes integrais da especificação e descrição da invenção. Todas as 5 referências citadas são aqui especificamente incorporadas a título de referência para tudo que é descrito aqui.

Aspectos dos presentes ensinamentos podem ser ainda compreendidos à luz dos exemplos que seguem, que não devem ser considerados como limitantes do escopo dos presentes ensinamentos. Será aparente 10 àqueles versados na técnica que muitas modificações, ambos a materiais e métodos, podem ser praticadas sem se afastar dos presentes ensinamentos.

7. EXEMPLOS

Conversão de celulose foi avaliada através de técnicas conhecidas no campo. Vide, por exemplo, Baker e outros, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 15 **70-72**:395-403 (1998) e conforme descrito abaixo. Cento e cinquenta microlitros de substrato por cavidade foram carregados em uma placa de microtitulação (MTP) de 96 cavidades de fundo plano usando uma pipeta de repetição. Vinte microlitros de solução de enzima apropriadamente diluída foram adicionados em cima. As placas foram cobertas com seladores de 20 placa de alumínio e postas em incubadoras em qualquer temperatura de teste, com agitação, pelos tempos especificados. A reação foi terminada através da adição de 100 μ L de Glicina 100 mM pH 10 a cada cavidade. Com mistura completa, os seus teores foram filtrados através de uma placa de filtro de 96 cavidades Millipore (0,45 μ m, PES). O filtrado foi diluído em uma 25 placa contendo 100 μ L de Glicina 10 mM pH 10 e a quantidade de açúcares solúveis produzida medida através de HPLC. As HPLCs Agilent 1100 séries eram todas equipadas com uma coluna de de-ashing/guard (Biorad Nº 125-0118) e uma coluna de carboidrato baseada em chumbo Aminex (Aminex HPX-87P). A fase móvel era água com uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min.

30 Resto de milho pré-tratado (PCS) - Resto de milho foi pré-tratado com 2% p/p de H_2SC_4 conforme descrito em Schell, D. e outros, *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 105:89-95 (2003) e seguido por lavagens múltiplas com

água deionizada para obter um pH de 4,5. Acetato de sódio foi adicionado para fazer uma concentração final de 50 mM e a solução foi titulada para pH 5,0. A concentração de celulase na mistura de reação era aproximadamente 7%.

5 Usando as celulases que seguem: celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase 1 (WC - BGL1) (vide, por exemplo, Patente U.S. N° 6.022.725), celulase integral de *Trichoderma reesei* expressando uma proteína de fusão CBH1-E1 (WC - CBH1-E1) (vide, por exemplo, Publicação de Patente U.S. N° 20060057672), Endoglucanase de 10 *Trichoderma reesei* 1 (EG1), cellobioiodrolase 1 de *Trichoderma reesei* (C-BH1) e cellobioiodrolase 2 de *Trichoderma reesei* (CBH2), cellobioiodrolase 1 de *Humicola grisea* (CBH1) e endoglucanase E1 de *Acidothermus cellulolyticus* (E1), exocelulase E3 de *Thermomonospora fusca* 3. A quantidade de enzima 15 foi provida em miligramas por grama de celulose. Os resultados são resumidos nas Figuras 1-12. A ordenada representa a fração de glicose com relação ao açúcar total (base peso/peso). Por exemplo, nas figuras 1-10, (A) a ordenada representa a duração de tempo de conversão e nas figuras 1-10, (B) a abscissa representa a conversão de açúcar solúvel total que é observada (cada tempo de incubação não é explicitamente marcado, mas um último tempo de incubação é indicado por conversão maior).

20 As figuras 1A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 3,3 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase, a 38°C (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados). Celulase integral de *T. reesei* com níveis de β-glicosidase elevados converte resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de glicose a 53°C do que a 38°C.

25 As figuras 2A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 12 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase, a 38°C (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados). Celulase integral de *T. reesei* com níveis de β-glicosidase elevados converte resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de glicose a 53°C do que 38°C.

As figuras 3A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 18 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase, a 38°C (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados). Celulase integral de *T. reesei* com níveis de β-glicosidase elevados converte resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de glicose a 53°C do que a 38°C.

As figuras 4A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 20 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase 1 a 38°C (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados). Celulase integral de *T. reesei* com níveis de β-glicosidase elevados converte resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de glicose a 53°C do que a 38°C.

As FIGURAS 5A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 25 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* superexpressando beta-glicosidase, a 38°C (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados). Celulase integral de *T. reesei* com níveis de β-glicosidase elevados converte resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de glicose a 53°C do que a 38°C.

As figuras 6A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 12 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei*, a 38°C (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados). Celulase integral de *T. reesei* converte resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de glicose a 53°C do que a 38°C.

As figuras 7A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 12 mg/g de celulase integral de *Trichoderma reesei* expressando uma proteína de fusão CBH1, a 38°C (símbolos abertos) e 53°C (símbolos fechados). Celulase integral de *T. reesei* converte resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de glicose a 53°C do que a 38°C.

As figuras 8A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 15 mg/g de uma mistura de celulase composta ou de EG1 de *T. reesei* e CBH1 de *T. reesei* (quadra-

dos) ou E1 e CBH1 de *H. grisea* (círculos) a 38°C (símbolos abertos) e 65°C (símbolos fechados). Misturas de celulase contendo E1 convertem resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de celobiose do que misturas contendo EG1.

5 As figuras 9A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 15 mg/g de uma mistura de celulase composta ou de EG1, CBH1 de *T. reesei* e CBH2 de *T. reesei* (quadrados) ou E1, CBH1 de *H. grisea* e CBH2 de *T. reesei* (círculos) a 38°C (símbolos abertos) e 65°C (símbolos fechados). Misturas de celulase contendo E1 convertem resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de celobiose do que misturas contendo EG1.

10 15

As figuras 10A-B mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido diluído em açúcares solúveis através de 15 mg/g de uma mistura de celulase composta ou de EG1, CBH1 de *T. reesei* e E3 de *T. fusca* (quadrados) ou E1, CBH1 de *H. grisea* e E3 de *T. fusca* (círculos) a 38°C (símbolos abertos) e 65°C (símbolos fechados). Misturas de celulase contendo E1 convertem resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de celobiose do que misturas contendo EG1.

20 As Figuras 11A-F mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido em açúcares solúveis através de celulase integral de *Trichoderma reesei* a 53°C (símbolos fechados) e 59°C (símbolos abertos) por 1 dia (A e B), 2 dias (C e D) e 3 dias (E e F). A ordenada representa a fração de glicose com relação ao açúcar total (base peso/peso) (A, B e E). A abscissa representa a dose de enzima usada (B, D e E). A abscissa representa 25 a conversão de açúcar solúvel total que é observada (cada dose não é explicitamente marcada, mas uma dose maior é indicada por conversão maior). Celulase integral de *T. reesei* converte resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de glicose em temperaturas altas.

30 As Figuras 12A-F mostram a conversão de resto de milho tratado com ácido em açúcares solúveis através de uma celulase integral de *Trichoderma reesei* expressando uma proteína de fusão CBH1-E1, a 53°C (símbolos fechados) e 59°C (símbolos abertos) por (A e B) 1, (C e D) 2 e (E

e F) 3 dias. A ordenada representa a fração de glicose com relação ao açúcar total (base peso/peso) (A, C e E). A abscissa representa a dose de enzima usada (B, D e F). A abscissa representa a conversão de açúcar solúvel total que é observada (cada dose não é explicitamente marcada, mas uma dose maior é indicada por conversão maior). Celulase integral de *T. reesei* converte resto de milho pré-tratado com ácido em uma fração maior de glicose em temperaturas altas.

É compreendido que os exemplos e modalidades descritos aqui são para propósitos ilustrativos apenas e que várias modificações ou mudanças à sua luz serão sugeridas a pessoas versadas na técnica e devem ser incluídas no espírito e limites do presente pedido e escopo das reivindicações apenas. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados aqui são aqui incorporados a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para conversão de um material celulósico em glicose, caracterizado pelo fato de que compreendendo as seguintes etapas:

combinar um material celulósico com uma celulase integral de

5 *Trichoderma reesei* de modo que a combinação resultante de material celulósico e celulase tenha 1% a 30% de celulose em peso; e

incubar a combinação de material celulósico e celulase em uma temperatura entre 55 °C e 65 °C por 0,1 hora a 96 horas em um pH de 4 a 9 de modo a causar uma reação de hidrólise para converter pelo menos 20% do

10 material celulósico em açúcares solúveis,

em que os açúcares solúveis compreendem glicose e celobiose, e a fração de glicose é pelo menos 0,75 em relação aos açúcares solúveis e a fração de glicose aumenta em temperaturas de incubação superiores a 50°C em comparação com a fração de glicose a uma temperatura de incubação de

15 38°C.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Trichoderma reesei* expressa uma enzima recombinante.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a enzima recombinante é uma beta-glicosidase.

20 4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o material celulósico é selecionado a partir do grupo compreendendo culturas de bioenergia, resíduos agrícolas, esgoto público sólido, refugo sólido industrial, refugo de jardim, madeira, refugo florestal, grama *switchgrass*, papel de refugo, lama de fabricação de papel, grão de milho, sabugos de milho, cascas de milho, restos de milho, gramas, trigo, palha de trigo, feno, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, sorgo, soja, árvores, grama *switchgrass*, feno, cevada, palha de cevada, palha de arroz e gramas.

25 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que ainda compreende a etapa de pré-tratar o material celulósico.

30 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato

de que o pré-tratamento é selecionado a partir do grupo compreendendo explosão de vapor, esmagamento, moagem, hidrólise ácida e combinações dos mesmos.

5 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que ainda compreende a etapa de determinar a quantidade de glicose.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que ainda compreende determinar a quantidade de açúcares solúveis.

10 9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a quantidade de celulase é de 2 a 40 mg/g de material celulósico.

FIG. 1(A)

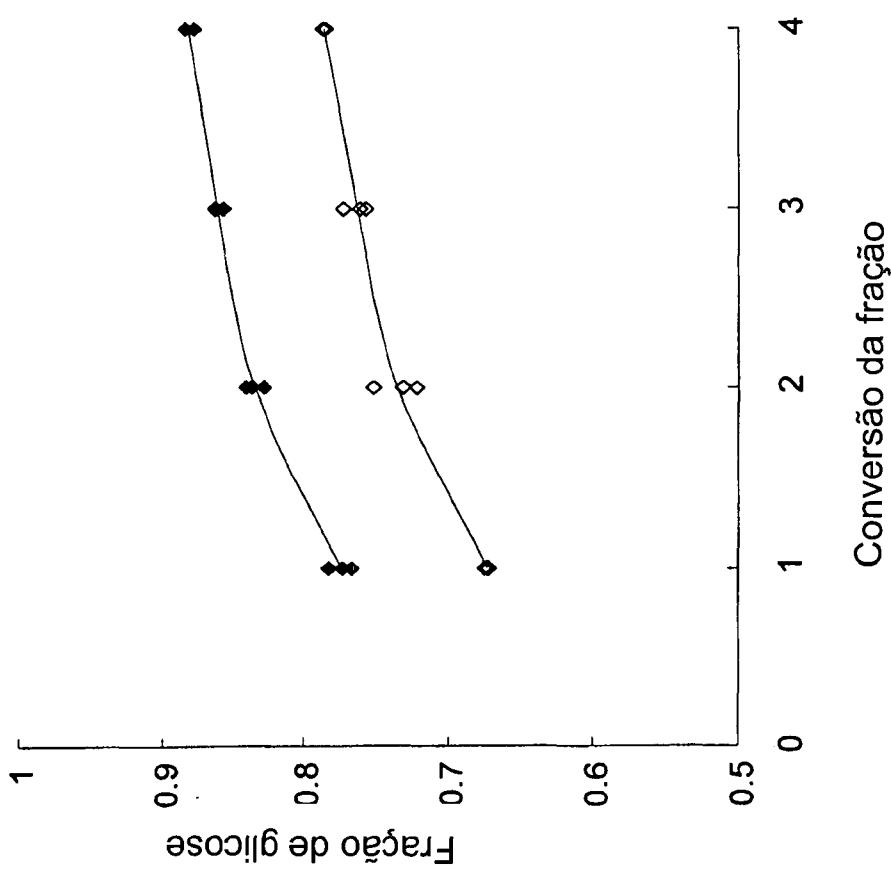


FIG. 1(B)

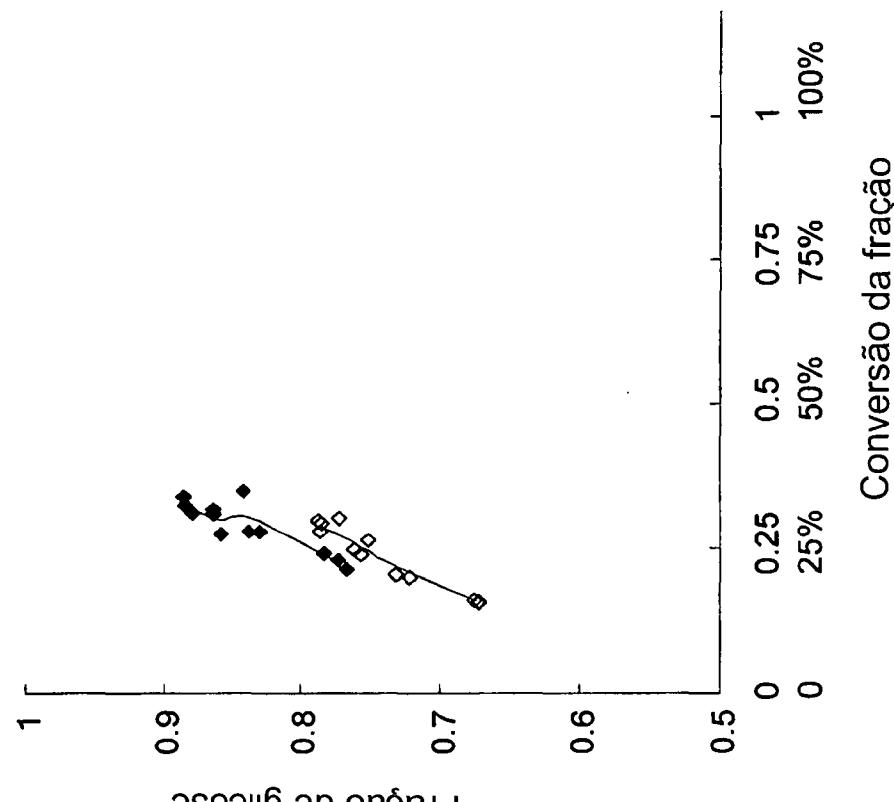


FIG. 2(A)

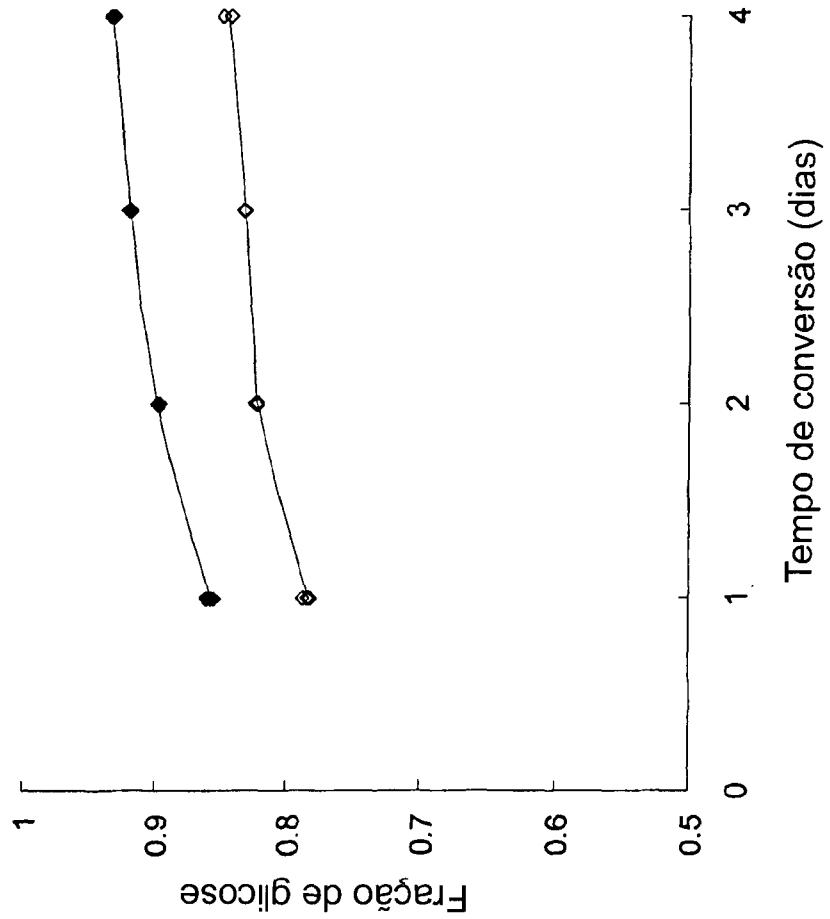


FIG. 2(B)

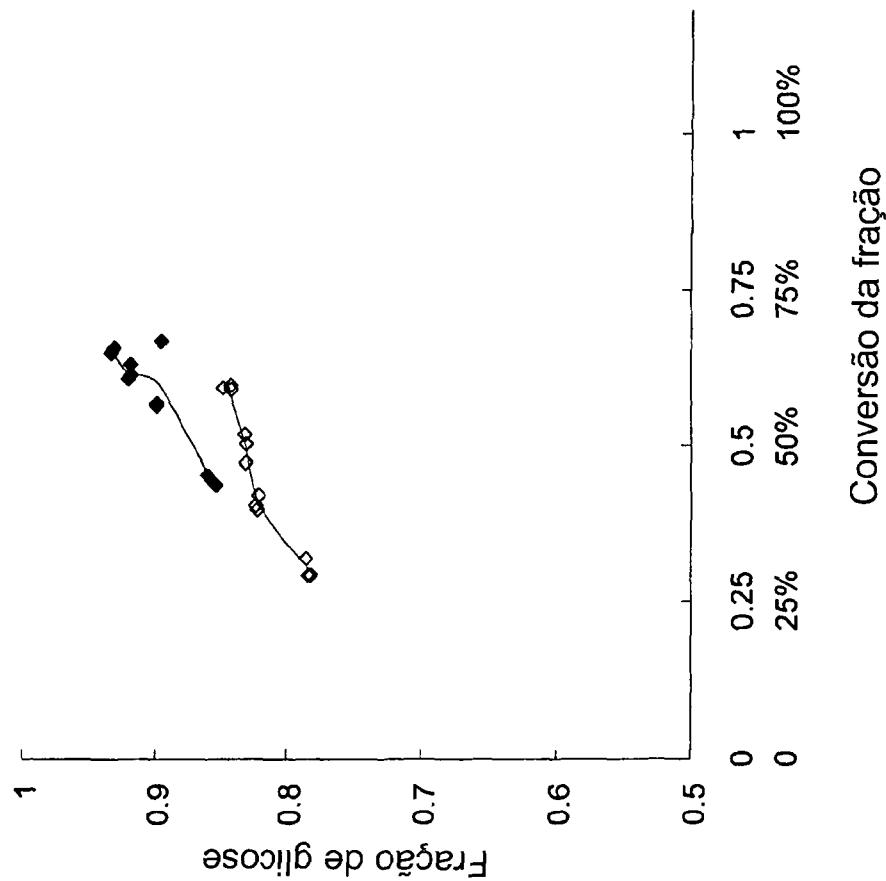


FIG. 3(A)

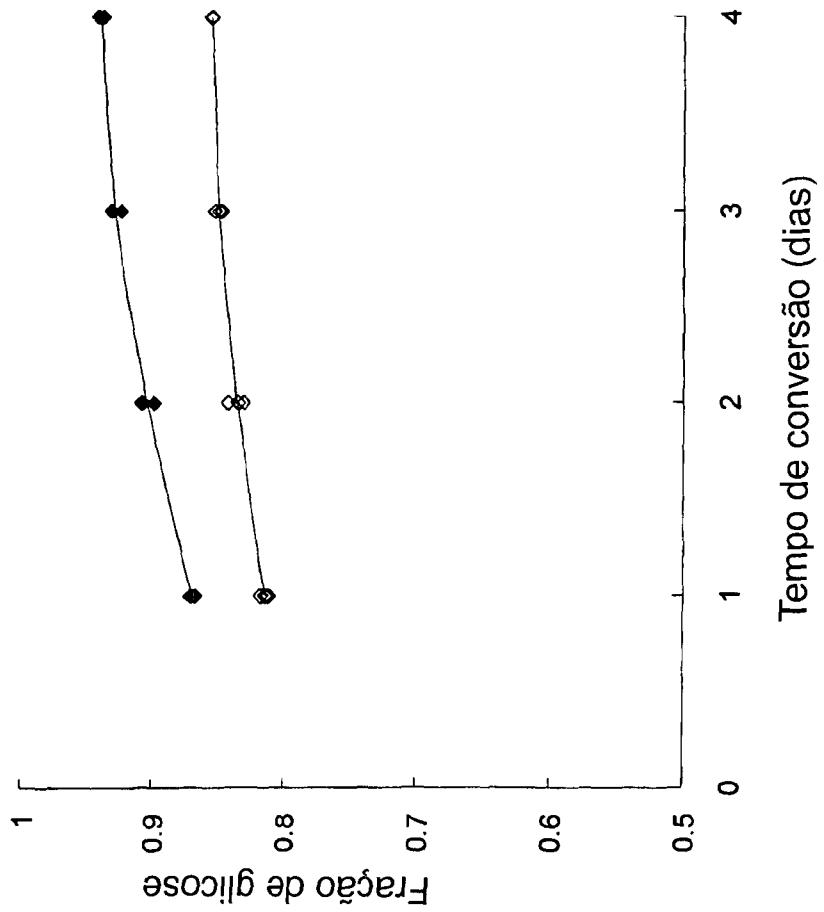


FIG. 3(B)

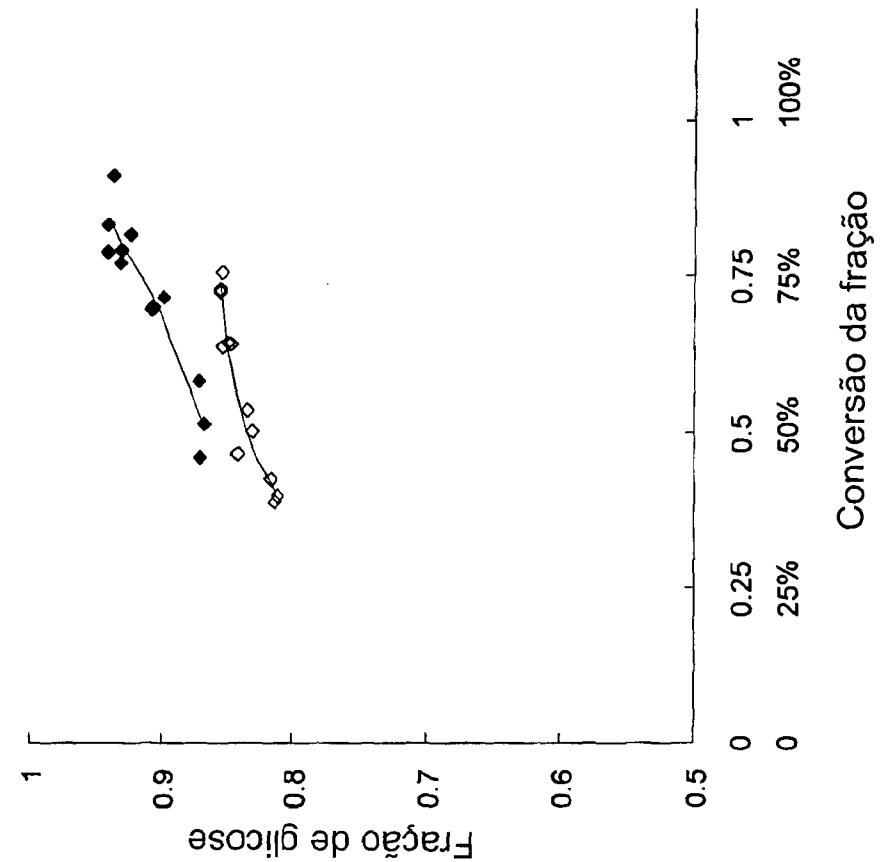


FIG. 4(A)

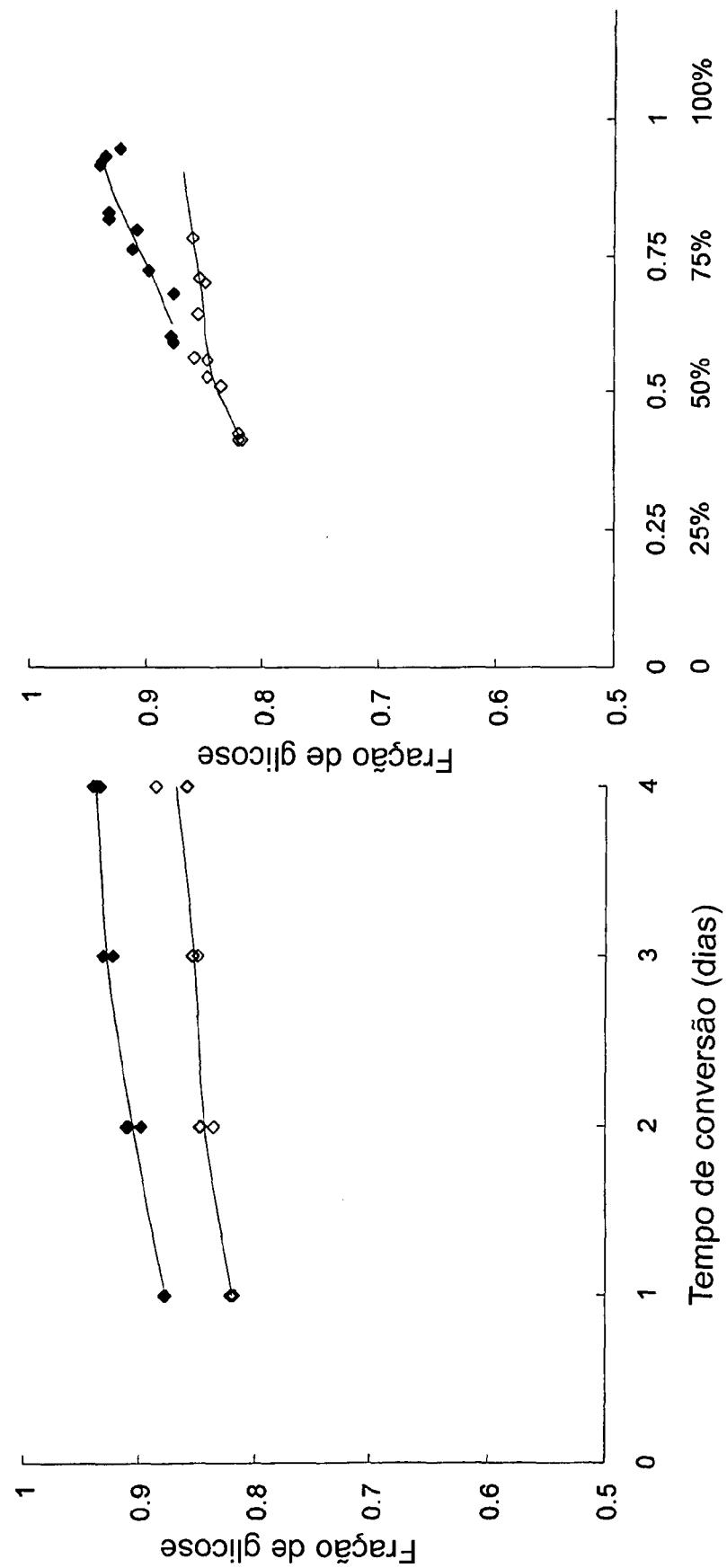


FIG. 4(B)

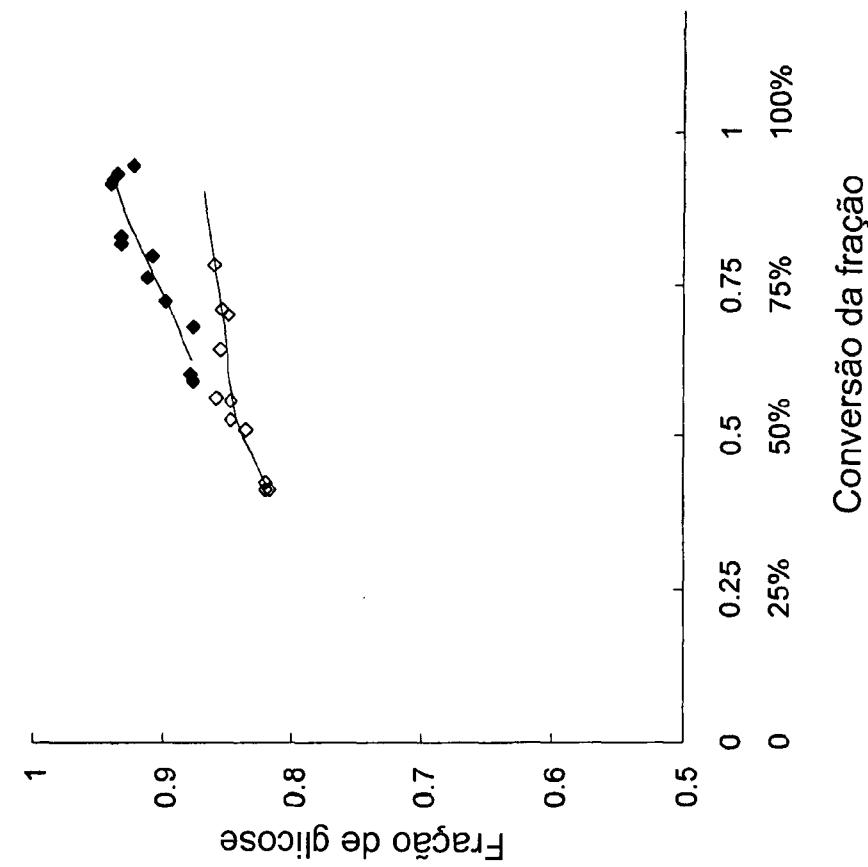


FIG. 5(A)

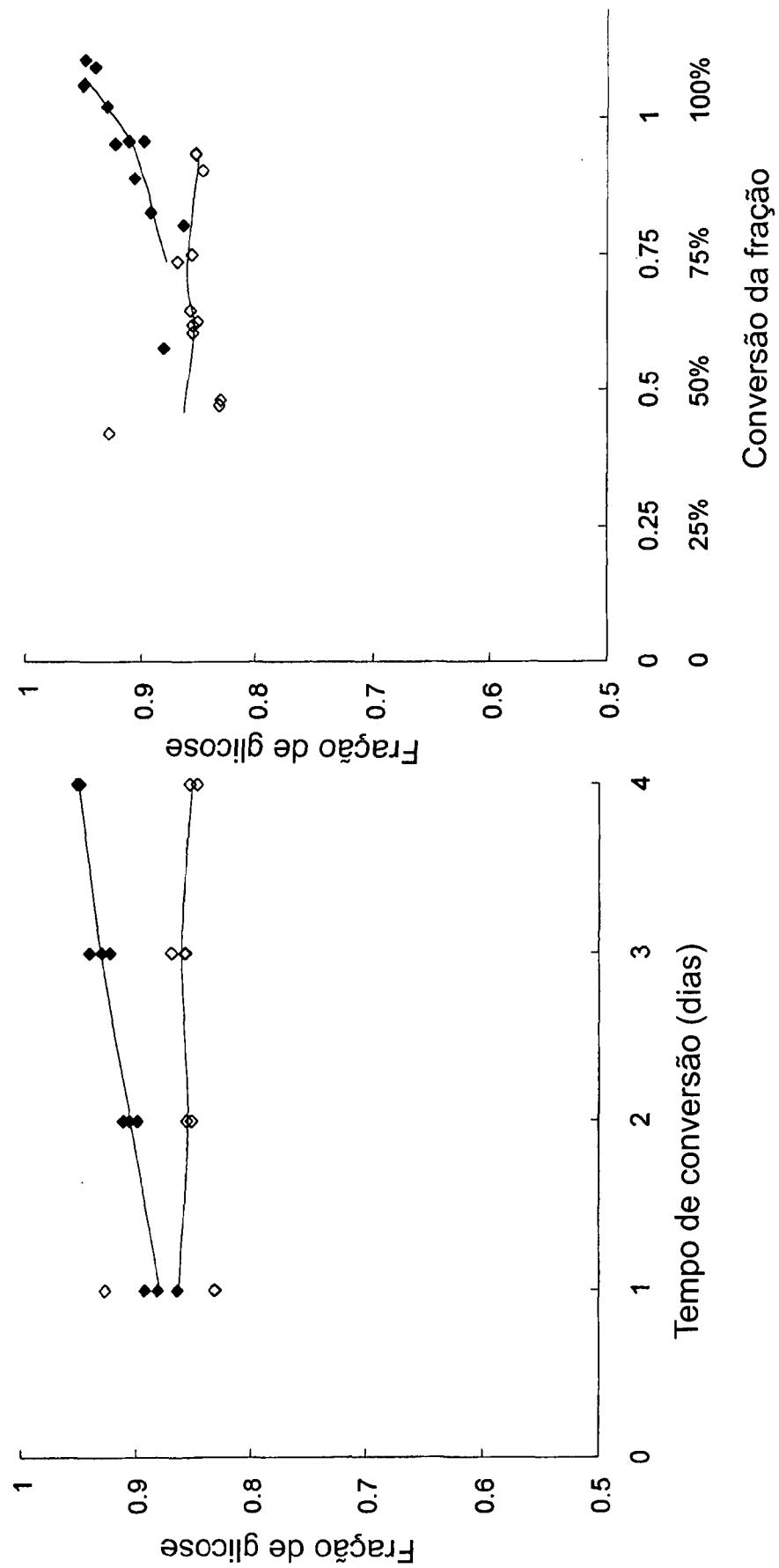


FIG. 5(B)

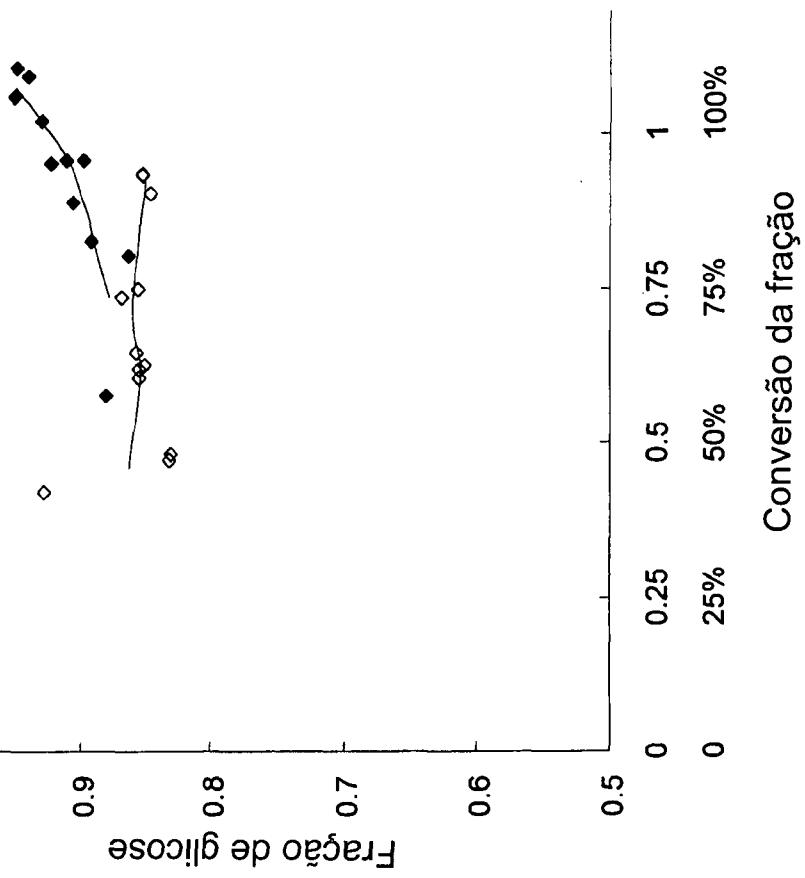


FIG. 6(A)

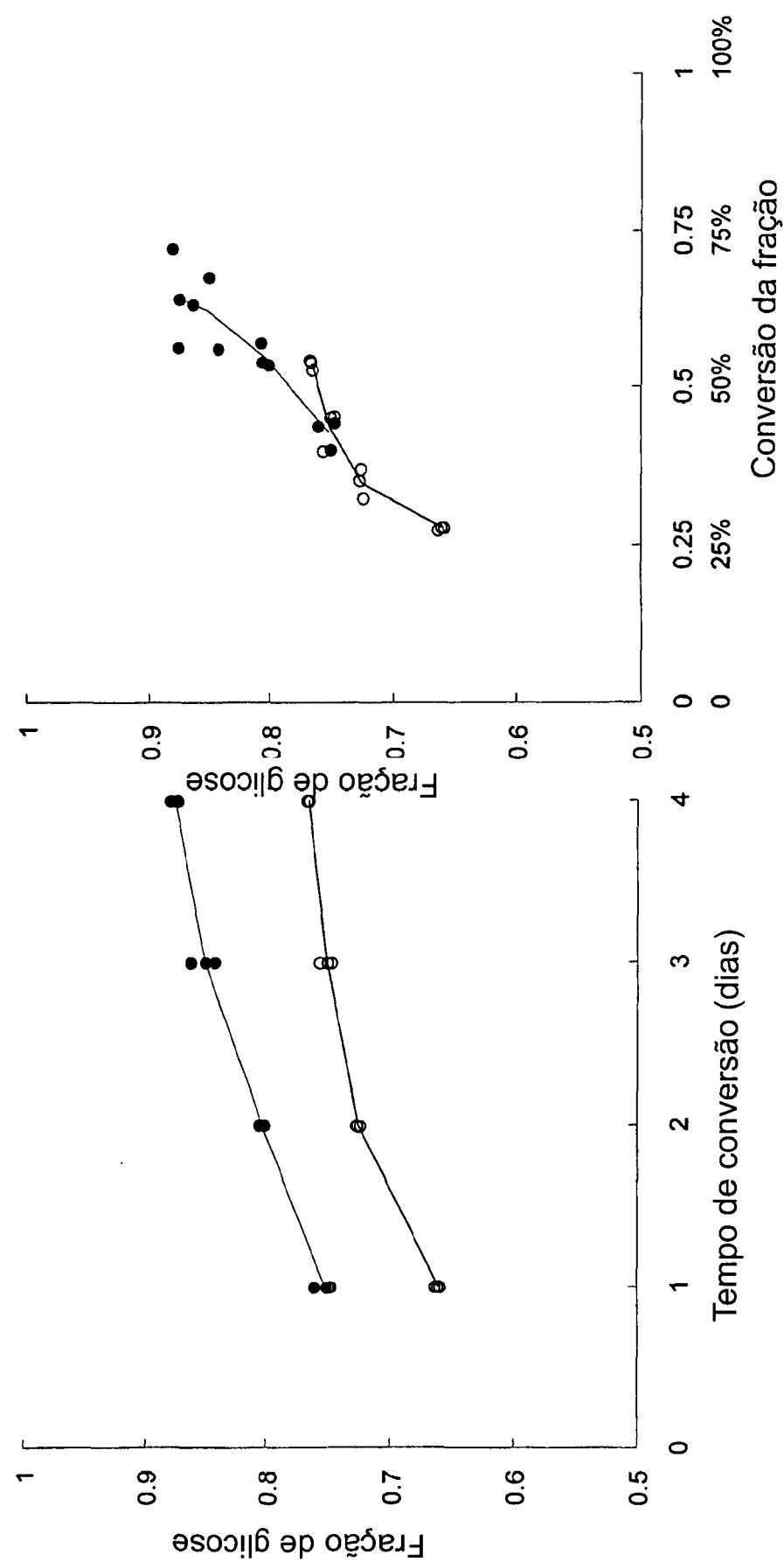


FIG. 6(B)

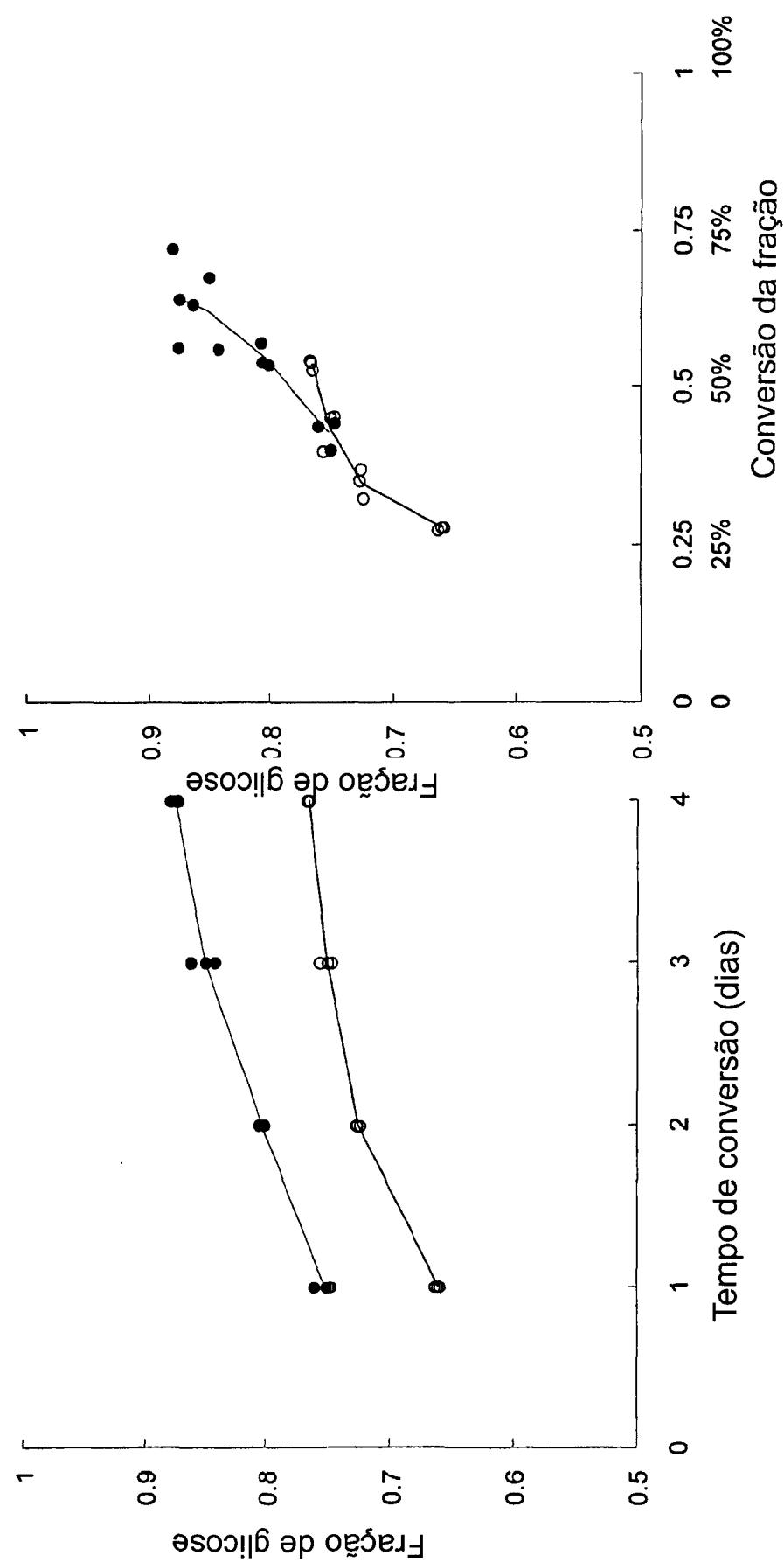


FIG. 7(A)

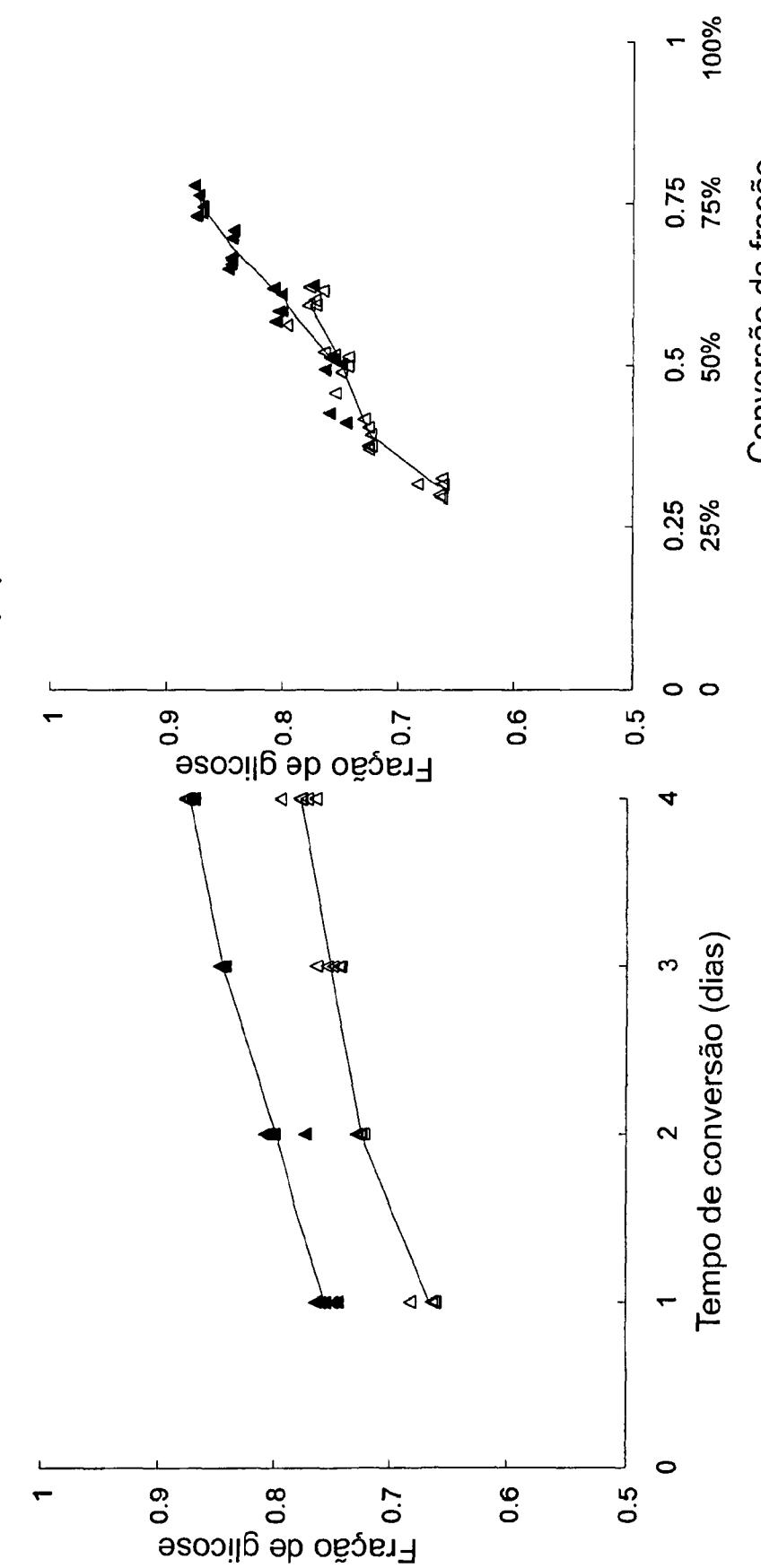


FIG. 7(B)

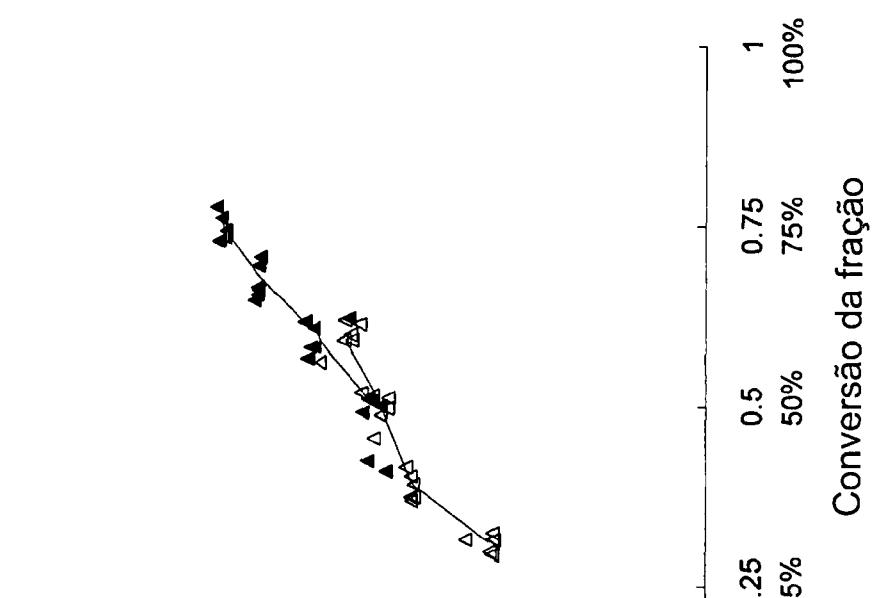


FIG. 8(A)

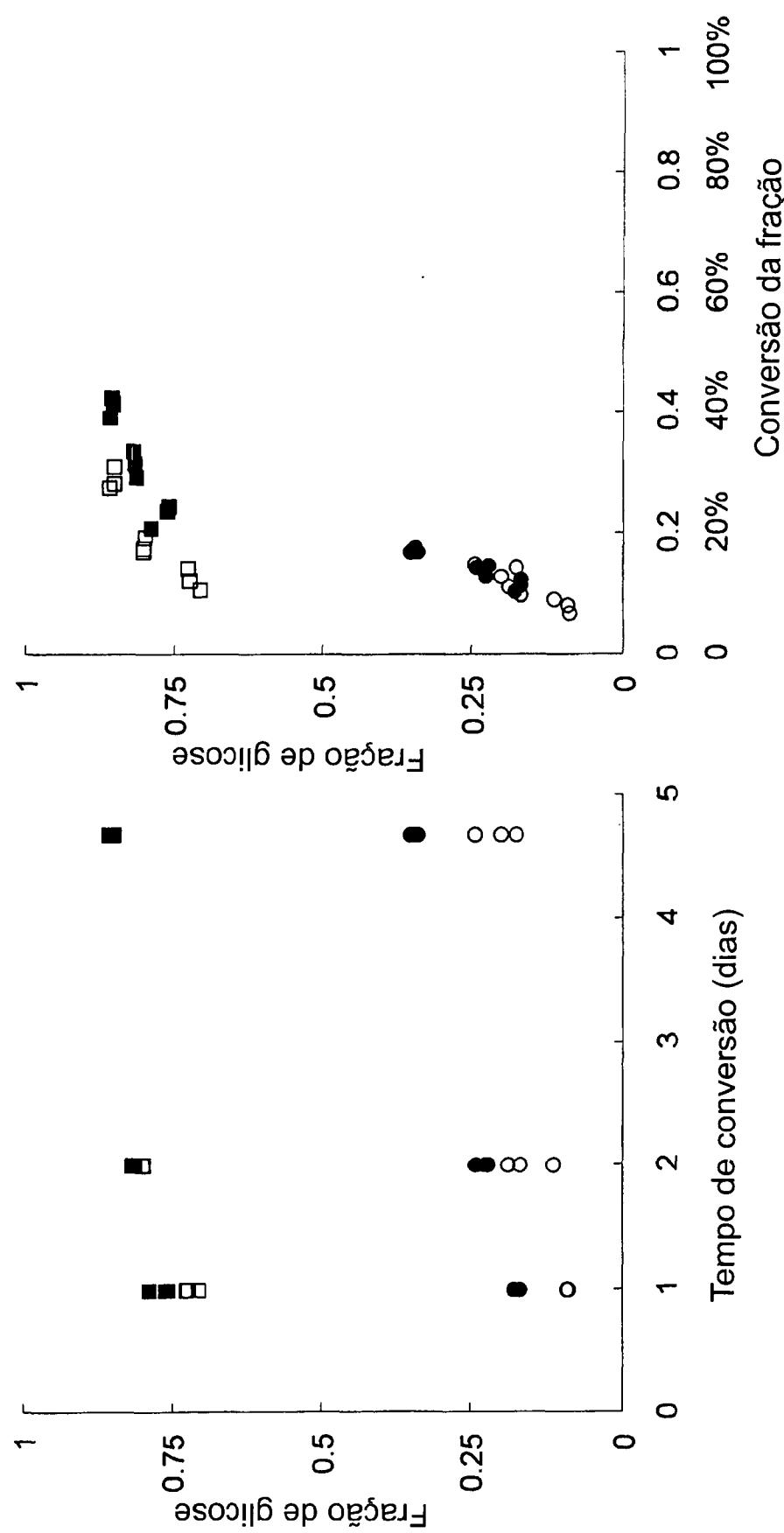


FIG. 8(B)

FIG. 9(A)

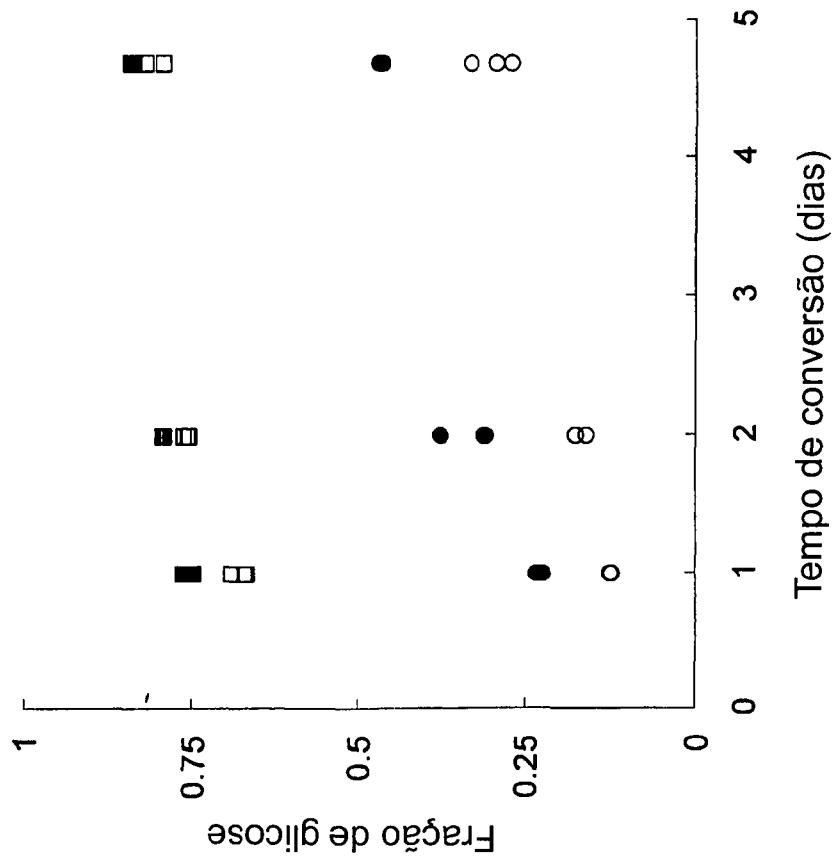


FIG. 9(B)

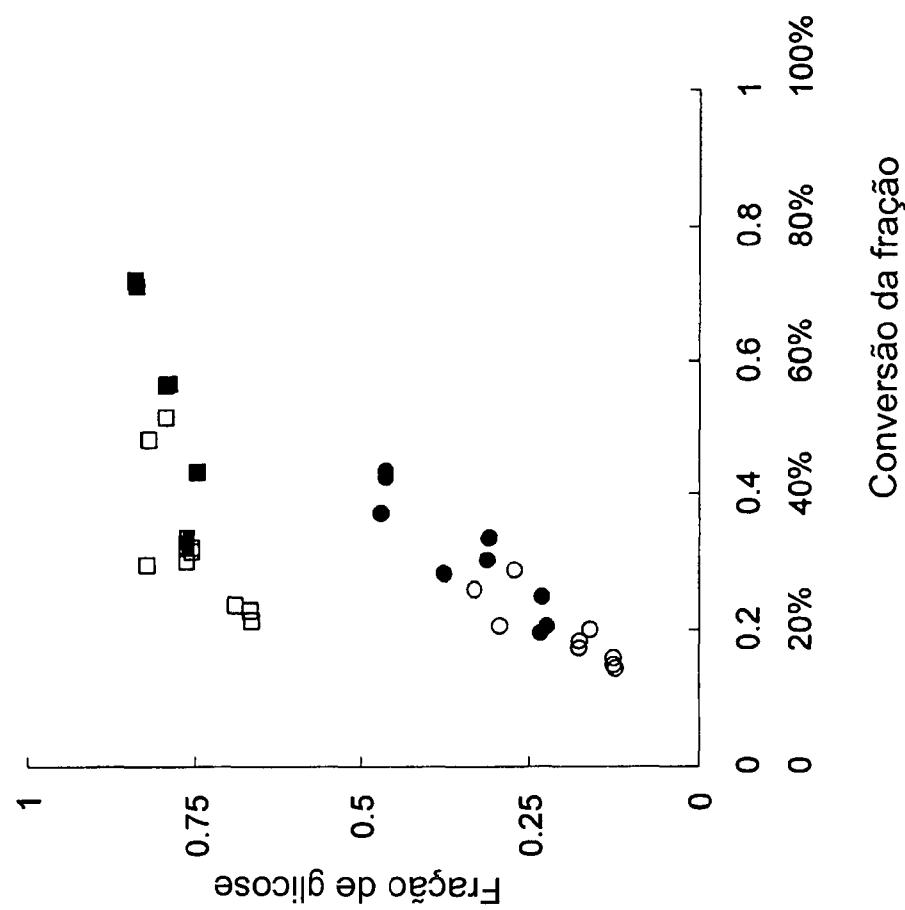


FIG 10(A)

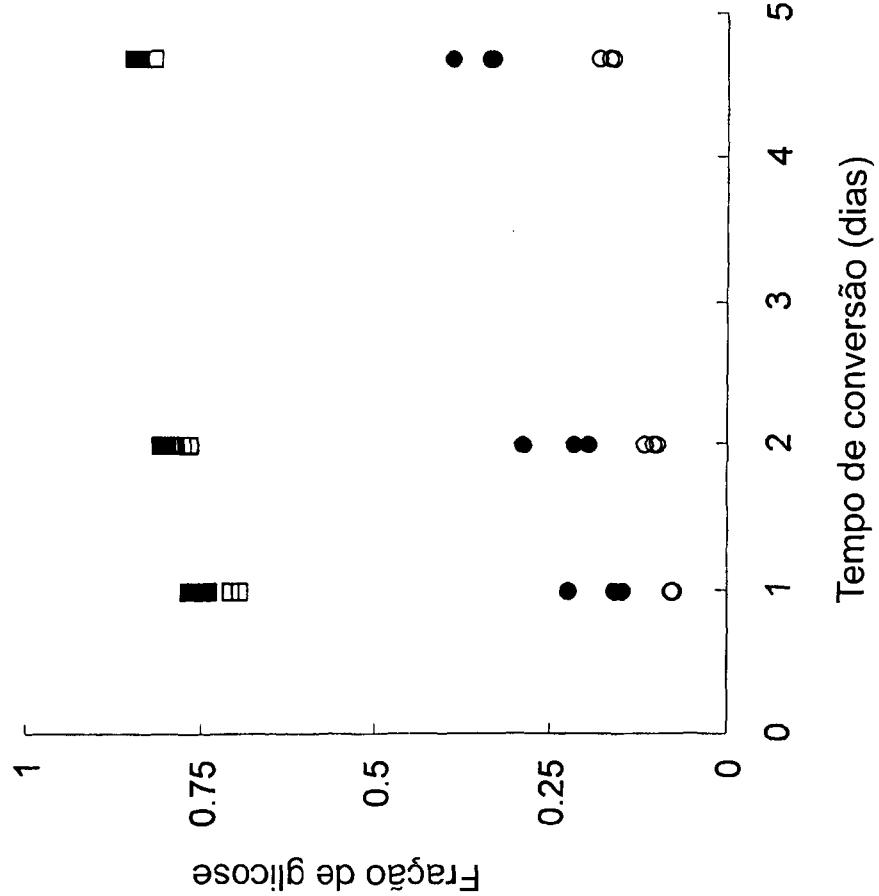


FIG. 10(B)

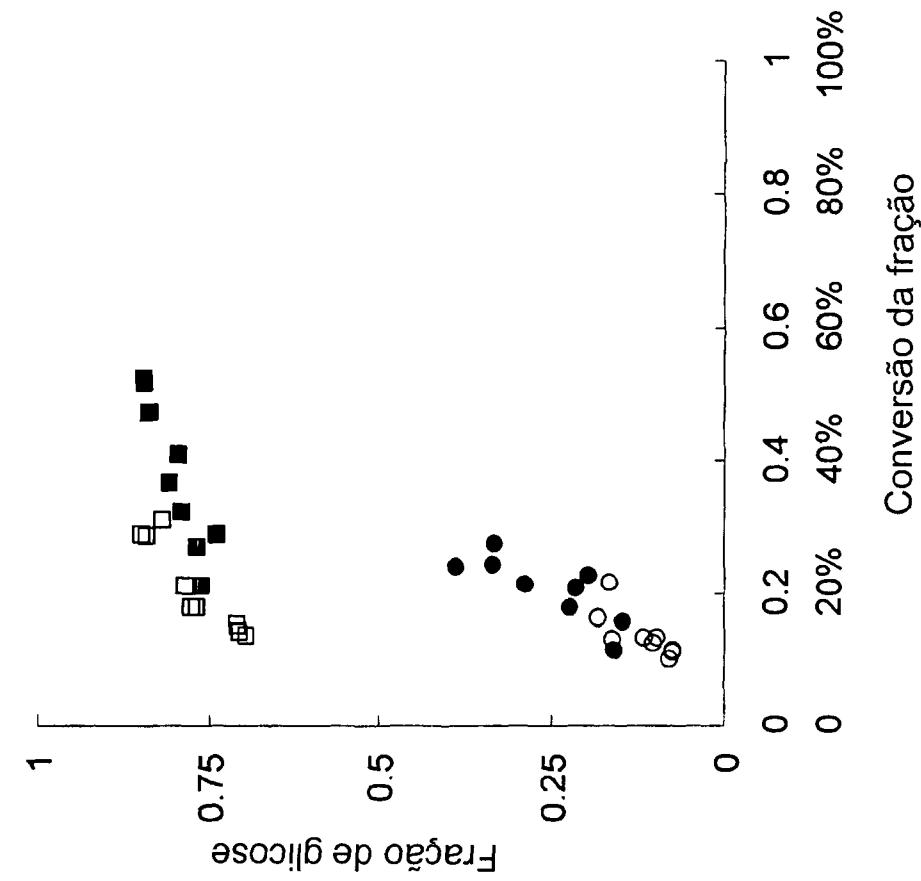


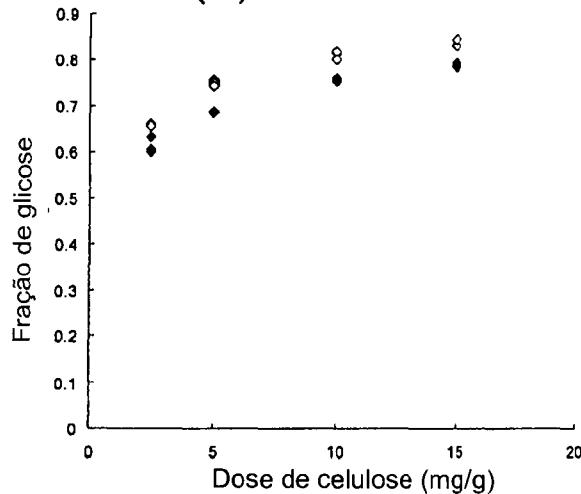
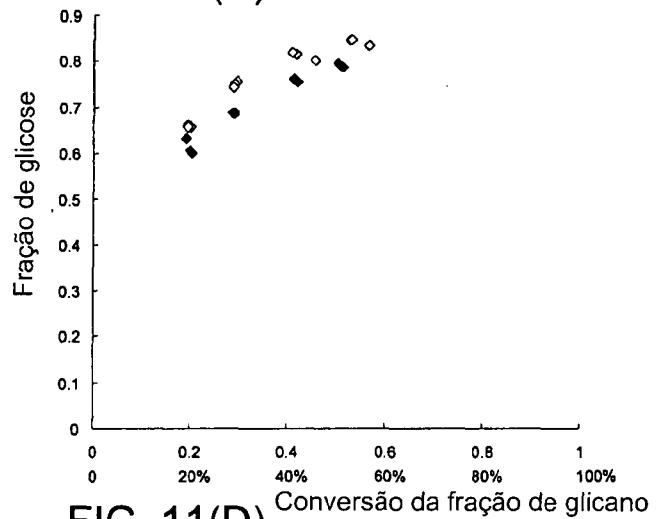
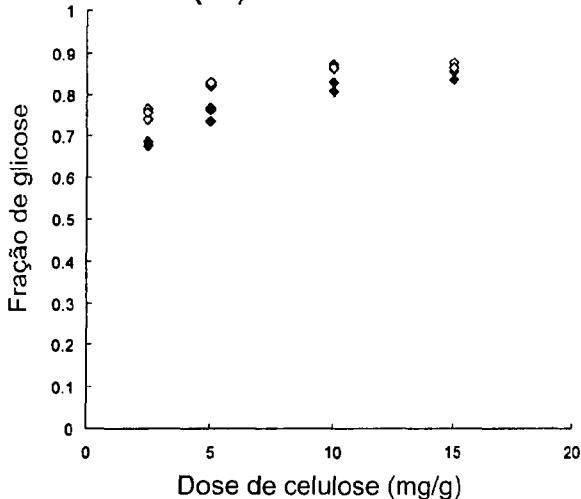
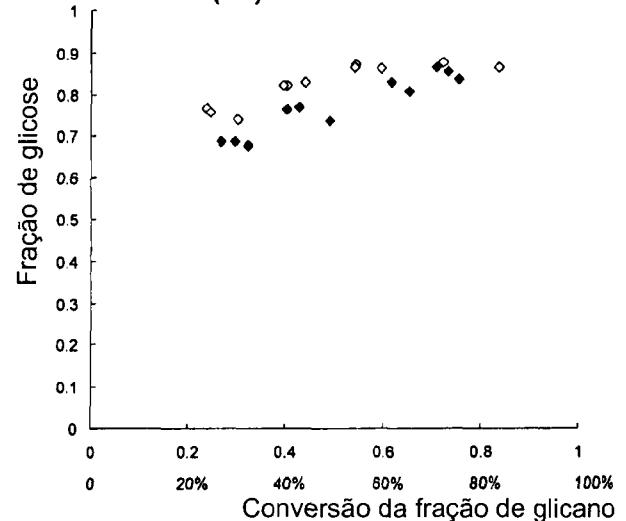
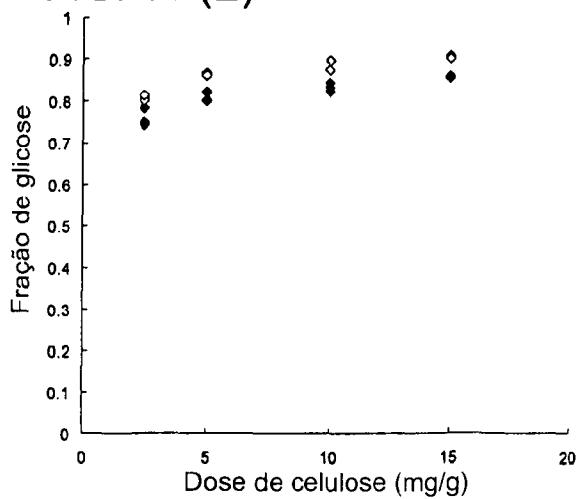
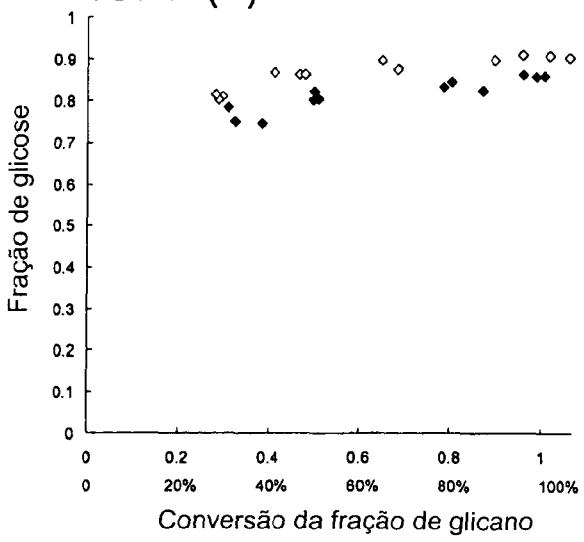
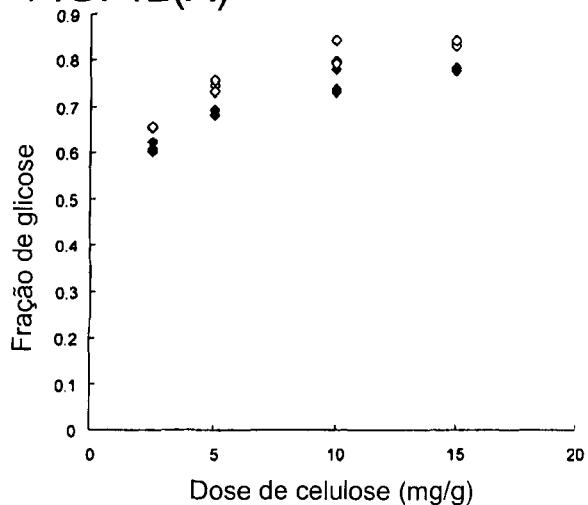
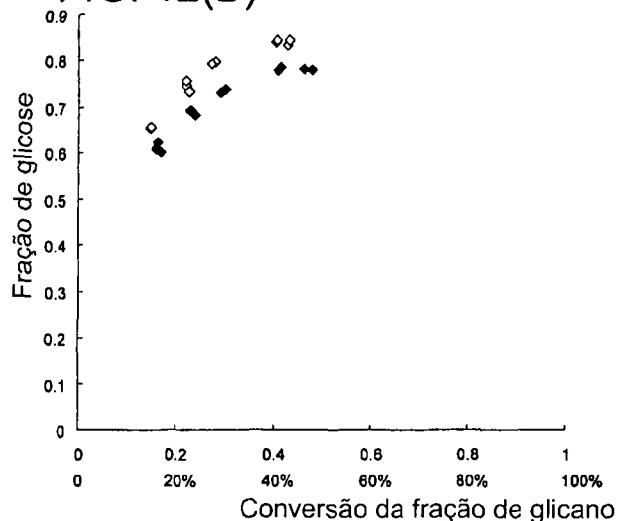
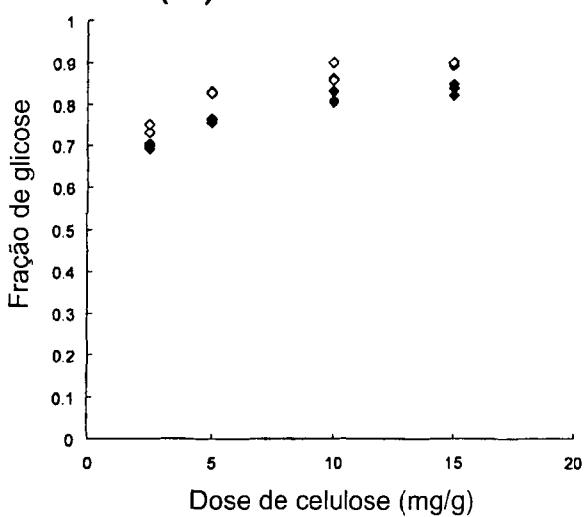
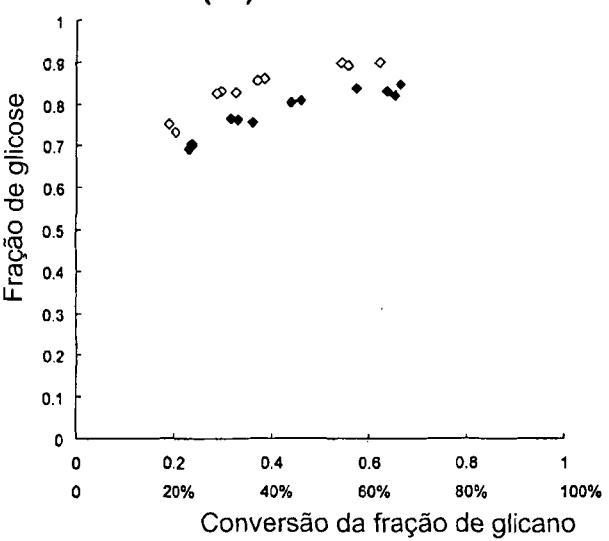
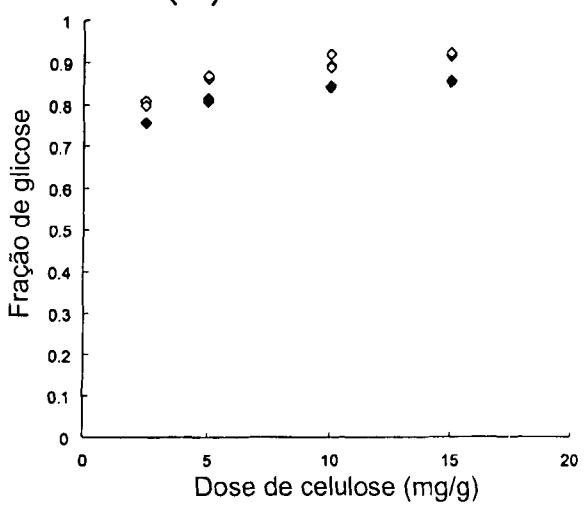
FIG. 11(A)**FIG. 11(B)****FIG. 11(C)****FIG. 11(D)****FIG. 11 (E)****FIG. 11(F)**

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