



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

(11) PI 0715930-7 B1

(22) Data do Depósito: 30/08/2007

(45) Data de Concessão: 02/01/2018



(54) Título: PROCESSO PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CARGAS DE ALIMENTAÇÃO LIGNOCELULÓSICAS PRÉ-TRATADAS E MISTURA DE ENZIMA CELULASE

(51) Int.Cl.: C12N 9/42; C12N 1/20; C12P 19/14; C12P 21/00

(30) Prioridade Unionista: 31/08/2006 US 60/841,443

(73) Titular(es): IOGEN ENERGY CORPORATION

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

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CARGAS DE ALIMENTAÇÃO LIGNOCELULÓSICAS PRÉ-TRATADAS E MISTURA DE ENZIMA CELULASE"**.

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma mistura de enzimas. Também é fornecido um processo para a hidrólise enzimática de uma carga de alimentação lignocelulósica, em particular para a hidrólise enzimática de uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada.

10 ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

O etanol combustível é correntemente produzido a partir de cargas de alimentação tais como amido de milho, cana de açúcar e beterraba açucareira. No entanto, o potencial para a produção de etanol a partir destas fontes é limitado quando a maioria das glebas de terra cultivada que é adequada para a
15 produção destas lavouras já está em uso para fornecer uma fonte alimentícia para seres humanos e animais. Além disso, a produção de etanol destas cargas de alimentação possui emissões de gás de estufa significativas porque os combustíveis fósseis são utilizados no processo de conversão.

A produção de etanol a partir de cargas de alimentação contendo
20 celulose, tais como resíduos agrícolas, pastos e resíduos de área florestal, tem recebido muita atenção nos últimos anos. As razões para isto são porque estas cargas de alimentação são amplamente disponíveis e baratas e seu uso para a produção de etanol fornece uma alternativa aos materiais residuais lignocelulósicos de queima ou aterro de lixo. Além do mais, uma
25 parte da carga de alimentação, lignina, pode ser usada como um combustível para prover de energia o processo, em vez dos combustíveis fósseis. Vários estudos concluíram que, quando o ciclo total de produção e consumo for levado em conta, o uso de etanol produzido a partir da celulose gera gases de estufa nas proximidades de zero.

30 As cargas de alimentação lignocelulósicas que são no máximo promissoras para a produção de etanol incluem (1) resíduos agrícolas tais como forragem agrícola, palha de trigo, palha de cevada, palha de aveia,

palha de arroz, palha de canola e palha de soja; (2) pastos tais como capim flexível, miscanthus, capim de corda, e reed canary grass; (3) resíduos do processo de fibras tais como fibra de milho, polpa de beterraba, finos e refugos de moinho de polpa e bagaço de cana de açúcar; (4) resíduos de área florestal tais como madeira de álamo, outras madeiras de lei, madeira macia e serragem; e (5) produtos de papel residual pós consumo.

A etapa do processo mais importante de converter uma carga de alimentação lignocelulósica em etanol envolve a conversão da celulose em glicose, para a subsequente conversão em etanol mediante a fermentação. Os dois processos primários para executar isto são a hidrólise ácida, que envolve a hidrólise da carga de alimentação usando uma etapa única de tratamento ácido, e a hidrólise enzimática, que envolve um pré-tratamento de ácido seguido pela hidrólise com enzimas celulasas.

No processo de hidrólise de ácido, a carga de alimentação é tipicamente submetida ao vapor e ácido sulfúrico em uma temperatura, concentração de ácido e duração do tempo que são suficientes para hidrolisar a celulose em glicose e a hemicelulose em xilose e arabinose. O ácido pode ser concentrado (25 a 80% p/p) ou diluído (3 a 8% p/p). A glicose é depois fermentada em etanol usando levedura, e o etanol é recuperado e purificado por destilação. Opcionalmente, a glicose pode ser fermentada em ácido láctico, butanol ou outros produtos.

No processo de hidrólise enzimática, as condições de reação são selecionadas tais que a área superficial da celulose é grandemente aumentada quando a carga de alimentação fibrosa for convertida em uma textura lamacenta, mas existe pouca conversão da celulose em glicose. A celulose pré-tratada é depois hidrolisada em glicose em uma etapa subsequente que utiliza enzimas celulasas, e o tratamento de vapor e/ou ácido neste caso é conhecido como pré-tratamento. A glicose pode depois ser fermentada em etanol, ácido láctico, butanol, ou outros produtos. Antes da adição da enzima, o pH da carga de alimentação ácida é ajustado para um valor que é adequado para a reação de hidrólise enzimática. Tipicamente, isto envolve a adição de álcali em um pH entre cerca de 4 a cerca de 6, que é a faixa de

pH ideal par muitas celulasas, embora o pH pode ser mais elevado se as celulasas alcalofílicas forem usadas.

Em um tipo de processo de pré-tratamento, a pressão produzida pelo vapor é derrubada rapidamente com descompressão explosiva, que é conhecida como explosão de vapor. Foody (Patente U.S. nº 4.461.648) descreve o equipamento e condições usadas no pré-tratamento de explosão de vapor. A explosão de vapor com ácido sulfúrico realizada em um pH de 0,4 a 2,0 produz material pré-tratado que é uniforme e requer menos enzima celulase para hidrolisar a celulose do que outros processos de pré-tratamento.

As enzimas de celulose catalisam a hidrólise da celulose (hidrólise de ligações β -1,4-D-glucan) na carga de alimentação em produtos tais como glicose, celobiose, e outros celoligossacarídeos. A celulase é um termo genérico que significa uma mistura de múltiplas enzimas compreendendo celobio-idrolases de exo-atuação (CBHs), endoglucanases (EGs) e β -glicosidases (β G) que podem ser produzidas por várias plantas e microorganismos. As enzimas na celulase de *Trichoderma reesei* que contêm um domínio de ligação de celulose incluem CBH1 (mais geralmente, Cel7A), CBH2 (Cel6A), EG1 (Cel7B), EG2 (Cel5), EG4 (Cel61A), EG5 (Cel45A), EG6 (Cel74A), Cip1, Cip2, acetil xilan esterase, β -mananase, e suolenina. EG3 (Cel12) é um exemplo de uma enzima celulolítica sem um domínio de ligação de celulose.

As enzimas de celulase trabalham sinergisticamente para hidrolisar a celulose em glicose. CBH1 e CBH2 atuam em extremidades opostas das cadeias de celulose para liberar celobiose (Barr e outros, 1996), enquanto as endoglucanases atuam nas localizações internas na celulose. O produto primário destas enzimas é a celobiose, que é ainda hidrolisada em glicose pela β -glicosidase. É sabido que a maioria das CBHs e EGs se liga à celulose na carga de alimentação através de módulos de ligação ao carboidrato (CBMs), tais como domínios de ligação a celulose (CBDs), enquanto a maioria das enzimas β -glicosidases, incluído as enzimas β -glicosidases *Trichoderma* e *Aspergillus*, não contém tais módulos de ligação e ficam em solução durante a hidrólise. Enzimas de celulase podem conter uma região de liga-

ção que fazem conexão com o domínio catalítico ao módulo de ligação ao carboidrato. A região de ligação é suposta de facilitar a atividade do domínio cataliticamente ativo.

Os cinéticos da hidrólise enzimática de substratos celulósicos insolúveis por celulasas não seguem o comportamento simples de Michaelis-Menten (Zhang e outros, 1999). Especificamente, aumentando a dosagem de celulase em uma reação de hidrólise não fornece um aumento linearmente dependente na quantidade de glicose produzida em um dado momento. Também existe uma diminuição significativa na taxa de reação quando a hidrólise de celulose continua (Tolan, 2002). Várias explicações foram propostas para explicar o declínio da taxa de reação. As hidroforeses principais incluem a inibição do produto, aumento da recalcitrância do substrato através do curso de uma hidrólise e inativação da enzima.

Os cinéticos da ação de celulase tornam a hidrólise enzimática do material de pré-tratamento uma etapa ineficiente na produção de etanol de celulose. A redução dos custos associada com a hidrólise enzimática, através do aumento da produção ou atividade da celulase, foi identificada como uma oportunidade importante para economizar os custos (Sheehan, 1999). Um relato recente de uma oficina de etanol celulósico patrocinado pela United States Department of Energy estimou um custo de 10 a 25 vezes mais elevado para a produção das enzimas para o etanol de celulose do que para as enzimas requeridas para produzir etanol de amido (Houghton, 2006).

Vários métodos foram tomados para aumentar a atividade das misturas de celulase. Aumentando a quantidade de β -glicosidase produzida pelo micro-organismo que também secreta as celulasas misturadas se alivia a inibição do produto pela celobiose (Patente U.S. nº 6.015.703). As técnicas de propósito racional ou mutagênese aleatória também podem ser usadas para modular as propriedades das enzimas individuais, como demonstrado pela produção de uma variante de CBH1 com termoestabilidade aumentada (WO 2005/0277172). Um método alternativo para explorar a diversidade genética é para diretamente examinar os homólogos de enzima de muitas espécies celulolíticas. Este método foi tomado com CBH1 (WO 2004/0197890)

e CBH2 (WO 2006/0053514). A construção de uma proteína de fusão que combina atividades complementares de enzimas endo- e exocelulolíticas também foi demonstrada (WO 2006/00057672). A estrutura de domínio modular das enzimas celulolíticas tem permitido a construção de enzimas compreendendo o domínio catalítico. A ausência de um CBD tem efeitos dramáticos sobre a ligação de substrato e as atividades destas enzimas (WO 2004/0053373, WO 2006/0008885). As enzimas de hidrólise de celulose geneticamente planejadas foram criadas as quais compreendem novas combinações do domínio cataliticamente ativo, da região de ligação e do CDB (Patente U.S. nº 5.763.254).

Todos os métodos descritos acima, embora direcionando os diferentes aspectos da hidrólise enzimática de celulose, não têm aumentado a atividade de celulase suficientemente para superar o custo elevado de celulase para a hidrólise de celulose. Uma desvantagem destas estratégias tem sido o foco em uma única enzima em um momento, negligenciando as possíveis sinergias com outras enzimas celulósicas.

Portanto, um melhor método para aumentar a atividade de um sistema de celulase é focalizar na maximização da atividade de uma mistura contendo mais do que um componente de celulase. Foi relatado que a eficiência da hidrólise de celulose por uma combinação de endo e exocelulases é muito maior do que seria esperado pela soma das atividades destas enzimas que atuam isoladamente (Wood e McCrae, 1979). Estudos anteriores mediram a sinergia entre as enzimas celulolíticas de *T. reesei* mediante a observação do comportamento das misturas binárias ou ternárias (por exemplo, Nidetsky e outros, 1994). Por exemplo, Wood e outros (1989) estudaram as misturas binárias, terciárias e setenárias de celobio-idrolases e endoglucanases de *Penicillium pinophilum*. Entretanto, o sinergismo não foi observado nas misturas binárias das enzimas de *Penicillium*. O sinergismo das combinações binárias destas enzimas da bactéria *Thermobifida fusca*, duas das quais são das mesmas famílias como aquelas compreendendo as enzimas principais de *Trichoderma*, também foi caracterizado (Jeoh, 2006). No entanto, o desempenho melhorado não foi relatado.

Várias tentativas foram feitas para desenvolver uma mistura de CBHs e EGs para maximizar a quantidade de hidrólise de celulose para uma dada dosagem de enzima (a dosagem de enzima é a massa de enzima requerida para hidrolisar uma dada massa de celulose). Por exemplo, as misturas otimizadas de celulasas de origem misturada incluindo bactérias, largamente derivadas de *T. fusca*, foram relatadas (Irwin, 1993; Walker e outros, 1993; Kim e outros, 1998). *Trichoderma* CBH1 e CBH2 foram incluídos nestes estudos, mas as bactérias são incapazes de produzir as 7 celulasas da família e EG1, portanto não foi parte destas misturas. Baker e outros (1998) tentaram determinar uma mistura ideal de *Trichoderma* CBH1, CBH2, e EG1, mas não incluíram EG2 em sua experiência. No caso de Baker e outros, o substrato foi Sigmacell, uma preparação de celulose microcristalina. Boisset e outros (2001) executaram uma otimização de uma mistura ternária de CBH1, CBH2 e EG5 derivada de *Humicola insolens* no substrato de celulose bacteriana. No entanto, estes estudos não foram bem sucedidos no desenvolvimento de misturas de enzima celulase com desempenho melhorado para a hidrólise de celulose dentro da biomassa lignocelulósica pré-tratada.

Assim, a despeito de muito esforço de pesquisa, permanece uma necessidade de uma mistura de enzimas celulasas melhorada para a hidrólise de celulose em uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada. A ausência de uma tal mistura de enzimas representa um grande obstáculo na comercialização de conversão de celulose em açúcares solúveis incluindo glicose para a produção de etanol e outros produtos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma mistura de enzimas. Também é fornecido um processo para a hidrólise enzimática de uma carga de alimentação lignocelulósica, em particular para a hidrólise enzimática de uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada.

É um objetivo da invenção fornecer um processo para uma hidrólise enzimática melhorada de uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada.

Em particular, a presente invenção fornece para a conversão

acentuada de uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada em açúcares solúveis utilizando um grupo de combinações das quatro enzimas celulases primárias, CBH1, CBH1, EG1 e EG2.

De acordo com um aspecto da invenção, é fornecido um processo para a hidrólise enzimática de uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada em açúcares solúveis, a hidrólise enzimática compreendendo a adição de uma mistura de enzimas celulases na carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada, a mistura de enzimas celulases compreendendo um mistura de celulases primárias de celobio-idrolases CBH1 e CBH2 e endoglucanases EG1 e EG2, as celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estando presentes em mais ou igual a 55% e menos do que 85% da mistura de celulase primária e a CBH2 estando presente em uma fração relativa às celobio-idrolases CBH1 e CBH2 como definida por f_{C2} e a EG2 estando presente em uma fração relativa às endoglucanases EG1 e EG2 como definida por f_{E2} , em que

quando as celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em mais ou igual a 55% e menos do que 65% das celulases primárias, a f_{C2} e a f_{E2} estão em valores incluídos dentro da zona 1 da figura 3A;

quando as celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em mais ou igual a 65% e menos do que 75% das celulases primárias, a f_{C2} e a f_{E2} estão em valores incluídos dentro das zonas 1, 2, e 3 da figura 3B; e

quando as celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em mais ou igual a 75% e menos do que 85% das celulases primárias, a f_{C2} e a f_{E2} estão em valores incluídos dentro das zonas 1, 2 e 3 da figura 3C.

De acordo com um outro aspecto da invenção é fornecida uma mistura de enzimas celulases como definido acima.

Preferivelmente, as celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em mais ou igual a 65% e menos do que 85% das celulases primárias. Quando ditas celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em 65% a 75% das celulases primárias, a f_{C2} e dita f_{E2} estão cada uma preferivelmente em valores incluídos dentro das zonas 2 e 3 da figura 3B. Preferivelmente, a f_{C2} e a f_{E2} estão cada uma em valores incluídos dentro da zona 3 da figura

3B. Quando as celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em 75% a 85% das celulases primárias, as f_{C2} e f_{E2} estão preferivelmente em valores incluídos dentro das zonas 2 e 3 da figura 3C. Preferivelmente, as f_{C2} e f_{E2} estão cada uma em valores incluídos dentro da zona 3 da figura 3C.

5 A presente invenção da mesma forma pertence a qualquer um dos aspectos anteriormente mencionados da invenção como definida acima, em que as celulases primárias são de uma fonte fúngica. As sequências de codificação da celulase primária podem ser de um *Ascomycete* ou *Basidiomycete*. Preferivelmente, as celulases primárias são de *Trichoderma ssp*,
10 *Aspergillus ssp*, *Hypocrea ssp* ou *Humicola ssp*. Mais preferivelmente, as sequências de codificação da celulase primária são de *Trichoderma reesei*.

A presente invenção também pertence a qualquer um dos aspectos anteriormente mencionados da invenção como definido acima, em que as celulases primárias são obtidas de um organismo mediante a expressão das sequências de codificação que são endógenas a dito organismo.
15 Alternativamente, as celulases primárias são obtidas de um organismo mediante a expressão das sequências de codificação que são heterólogas a dito organismo. Preferivelmente, as celulases primárias são de *Trichoderma reesei*.

20 Preferivelmente, a hidrólise enzimática converte pelo menos cerca de 80% da celulose na carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada em açúcares solúveis. Os açúcares solúveis podem ser fermentados para produzir etanol, ácido láctico, butanol, ou uma combinação destes.

A hidrólise enzimática é preferivelmente realizada com enzimas
25 celulases compreendendo β -glucosidase e uma secretoma de *Trichoderma reesei*.

As misturas de celulase primária incluídas pela invenção apresentam atividade significativamente mais elevada do que aquelas descritas na técnica anterior. Os resultados mostram que as misturas de celulase da
30 presente invenção são de cerca de 10% a cerca de 50%, ou qualquer quantidade entre estas, cerca de 10% a cerca de 25%, ou qualquer quantidade entre estas, ou de cerca de 10% a cerca de 15%, ou qualquer quantidade

entre estas, mais potentes ou mais ativas do que as misturas de celulase correntemente disponíveis.

A possibilidade econômica da tecnologia de celulose em etanol foi limitada pelo custo das enzimas celulases. Mediante o fornecimento de enzimas com atividade melhorada, as enzimas celulases da presente invenção aumentam a economia do processo e representam um avanço significativo sobre a técnica anterior.

Este sumário da invenção não necessariamente descreve todos os aspectos da invenção.

10 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 contém a análise SDS-PAGE e Western blot dos componentes de celulase primária purificados. A figura 1A mostra uma mancha Coomassie Blue de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 purificadas após a SDS-PAGE. Uma celulase de *Trichoderma* foi analisada em paralelo para comparação. A figura 1B mostra que as Western blots específicas do componente destas amostras foram executadas seguinte a separação de SDS-PAGE e eletrotransferência para uma membrana de PVDF.

A figura 2 é um gráfico de coluna que descreve os resultados das análises ELISA. As colunas pretas sólidas ilustram a composição percentual de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 na celulase de *Trichoderma* comercial. As colunas remanescentes demonstram o nível de especificidade de cada ELISA. A composição percentual de: CBH1 em celulase desprovida de CBH1 (a), CBH2 em uma celulase desprovida de CBH2 (b), EG1 em uma celulase desprovida de EG1 (c) e EG2 em uma celulase desprovida de EG2 (d) é apresentada.

A figura 3 mostra diagramas das atividades de enzima de misturas de celulase primária contendo CBH1, CBH2, EG1 e EG2. As atividades de várias misturas de celulase são traçadas em gráfico quando medidas em vários conteúdos fracionais de EG2 em relação à quantidade total de EG e CBH2 em relação ao conteúdo total de CBH (descrito como f_{E2} e f_{C2} , respectivamente). O valor listado dentro de cada quadrado indica a atividade da mistura comparada com um valor de ponto de referência como descrito nos

exemplos. As atividades das várias misturas de celulase são expressas em relação às atividades de um Benchmark Blend (CBH1, CBH2, EG1, EG2, em 57%, 29%, 7%, 7%, em peso). A figura 3A mostra as atividades das misturas em que o teor de CBH1 e CBH2 combinado é mais ou igual a 55% e menos do que 65% das celulases primárias totais. A figura 3B mostra as atividades das misturas em que o teor de CBH1 e CBH2 combinado é mais ou igual a 65% e menos do que 75% das celulases primárias totais. A figura 3C mostra as atividades das misturas em que o teor de CBH1 e CBH2 combinado é mais ou igual a 75% e menos do que 85% das celulases primárias totais. A figura 3D mostra as atividades das misturas em que o teor de CBH1 e CBH2 combinado é mais ou igual a 85% e menos do que ou igual a 95% das celulases primárias totais.

A figura 4 é um diagrama tridimensional que mostra as regiões ocupadas pelas misturas melhoradas de celulases primárias no espaço de mistura definido por %CBH, f_{C2} e f_{E2} . As atividades são em relação ao Benchmark Blend. Cada par de imagens fornece duas vistas da mesma região e difere em uma rotação de 180° ao redor do eixo %CBH. A figura 4A mostra as misturas compreendendo a zona 1 da figura 3A e as regiões das zonas 1, 2 e 3 das figuras 3B e 3C. A figura 4B mostra as misturas compreendendo as regiões das zonas 2 e 3 das figuras 3B e 3C. A figura 4C mostra as misturas compreendendo as regiões da zona 3 das figuras 3B e 3C.

A figura 5 é um diagrama que mostra a conversão do substrato lignocelulósico pré-tratado pela mistura de ponto de referência, que é uma mistura composta de celulases primárias nas proporções relativas observadas em uma celulase tipo silvestre, e uma mistura melhorada representativa.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma mistura de enzimas. Também é fornecido um processo para a hidrólise enzimática de uma carga de alimentação lignocelulósica, em particular para a hidrólise enzimática de uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada.

A seguinte descrição é das modalidades preferidas.

A presente invenção refere-se a um mistura de enzimas celula-

ses compreendendo celulases primárias para ser usada para a hidrolização de uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada. "Enzimas de celulase primária" ou "celulases primárias" são definidas como as celobio-idrolases, CBH1 e CBH2, e as endoglucanases, EG1 e EG2. Além das celu-
 5 lases primárias, CBH1, CBH2, EG1 e EG2, a mistura de enzimas celulases pode compreender celulases adicionais assim como componentes de enzima β -glucosidase como descrito com outros detalhes abaixo.

As seguintes definições se referem à classificação de celobio-idrolases, endoglucanases e β -glucosidases como definido pela Joint Com-
 10 mission on Biochemical Nomenclature of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Published in Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, California, ISBN 0-12-227164-5; with suppliments in Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250; 1-6, e Eur. J. Biochem.
 15 1999, 264, 610-650, cada uma das quais são aqui incorporadas por referência; vide também: chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/) e às famílias de glicoidrolase de celulases e β -glucosidases como definido pelo sistema CAZy que é aceito como uma nomenclatura padrão para as enzimas glicoidrolases (Coutinho, P.M. & Henrissat, B., 1999, "Carbohydrate-active enzymes: an
 20 integrated database approach." In Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering, H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12, que é aqui incorporado por referência; vide também: afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/) e é familiar a aqueles versados na técnica.

25 "CBH1" é uma enzima ativa de carboidrato expressa a partir de uma sequência de DNA que codifica um domínio catalítico de Família 7 de glicoidrolase (GH) classificado sob EC 3.2.1.91. Qualquer enzima ativa de carboidrato com uma identidade de sequência de aminoácido de 60% a 100% em qualquer enzima CBH1 ou mais preferivelmente de 65% a 100%
 30 de identidade de sequência de aminoácido e que apresenta atividade de CBH1 como conhecido por uma pessoa versada na técnica (vide referências para a nomenclatura de celobio-idrolase), é similarmente definida como uma

CBH1. Por exemplo, a CBH1 pode ser qualquer enzima ativa de carboidrato com 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100% de identidade de sequência de aminoácido em qualquer enzima CBH1 e que apresenta atividade de CBH1 como conhecido por uma pessoa versada na técnica. Preferivelmente, a CBH1 é funcionalmente ligada a um módulo de ligação ao carboidrato (CBM) com uma alta afinidade para celulose cristalina, tal como um domínio de ligação de celulose da Família 1.

A identidade de sequência pode ser facilmente determinada pelo alinhamento dos aminoácidos das duas sequências, usando alinhamento manual, ou qualquer algoritmo de alinhamento de sequência como conhecido versado da técnica, por exemplo, mas não limitado a estes, algoritmo BLAST (BLAST and BLAST 2.0; Altschul e outros, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; e Altschul e outros, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990), o algoritmo descrito por Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento por homologia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), pela pesquisa com relação ao método de similaridade de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), ou pelo alinhamento manual e inspeção visual (vide, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel e outros, eds. 1995 supplement)).

A "CBH2" é definida como uma enzima ativa de carboidrato expressa a partir de uma sequência de DNA que codifica um domínio catalítico da Família 6 de glicoidrolase (GH) classificado sob EC 3.2.1.91. Qualquer enzima ativa de carboidrato com 60% a 100% de identidade de sequência de aminoácido em qualquer enzima CBH2, ou mais preferivelmente de 65% a 100% de identidade de sequência de aminoácido e que apresenta atividade de CBH2 como conhecido por uma pessoa versada na técnica (vide referências para a nomenclatura de celobio-idrolase), é similarmente definida como uma CBH2. Por exemplo, a CBH2 pode ser qualquer enzima ativa de carboidrato com 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100% de identidade de se-

quência de aminoácido em qualquer enzima CBH2 e que apresenta atividade de CBH2 como conhecido por uma pessoa versada na técnica. Preferivelmente, a CBH2 é funcionalmente ligada a um módulo de ligação ao carboidrato (CBM) com uma afinidade elevada para celulase cristalina, tal como um domínio de ligação de celulose de Família 1. A identidade de sequência pode ser determinada como acima delineado.

"EG1" é definida como uma enzima ativa de carboidrato expressa a partir de uma sequência de DNA que codifica um domínio catalítico de Família 7 da glicoidrolase (GH) classificado sob EC 3.2.1.4. Qualquer enzima ativa de carboidrato com 60% a 100%, ou mais preferivelmente de 65% a 100% de identidade de sequência de aminoácido em qualquer enzima EG1 e que apresenta atividade de EG1 como conhecido por uma pessoa versada na técnica (vide referências com relação a nomenclatura de endoglucanase), é similarmente definida como uma EG1. Por exemplo, a EG1 pode ser qualquer enzima ativa de carboidrato com 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100% de identidade de sequência de aminoácido em qualquer enzima EG1 e que apresenta atividade de EG1 como conhecido por uma pessoa versada na técnica. Preferivelmente, a EG1 é funcionalmente ligada a um módulo de ligação ao carboidrato (CBM) com uma afinidade elevada para celulase cristalina, tal como um domínio de ligação de celulose da Família 1. A identidade de sequência pode ser determinada como acima delineado.

A "EG2" é definida como uma enzima ativa de carboidrato expressa a partir de uma sequência de DNA que codifica um domínio catalítico da Família 5 de glicoidrolase (GH) classificado sob EC 3.2.1.4. Qualquer enzima ativa de carboidrato com 60% a 100% de identidade de sequência de aminoácido, ou mais preferivelmente de 65% a 100% de identidade de sequência de aminoácido em qualquer enzima EG2 e que apresenta atividade de EG2 como conhecido por uma pessoa versada na técnica (vide referências para a nomenclatura de endoglucanase), é similarmente definida como uma EG2. Por exemplo, a EG2 pode ser qualquer enzima ativa de carboidrato com 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100% de identidade de sequência de aminoácido em qualquer enzima EG2 e que apresenta atividade de EG2

como conhecido por uma pessoa versada na técnica. Preferivelmente, a EG2 é funcionalmente ligada a um módulo de ligação ao carboidrato (CBM) com uma afinidade elevada para celulase cristalina, tal como um domínio de ligação de celulose da Família 1. A identidade de sequência pode ser deter-
 5 minada como acima descrito.

" β -Glucosidase" é definida como qualquer enzima da família 3 de GH que também é classificada sob EC 3.2.1.21. A BGL1 é definida como a enzima expressa do gene *bgl1* de *Trichoderma reesei*. Qualquer sequência de proteína com 60% a 100% de identidade de sequência de aminoácido
 10 para a enzima BGL1 ou mais preferivelmente de 65% a 100% de identidade de sequência de aminoácido e que apresenta atividade de β -glucosidase como conhecido por uma pessoa versada na técnica (vide referências para a nomenclatura de endoglucanase), é similarmente definida como uma BGL1. Por exemplo, a BGL1 pode ser qualquer enzima ativa de carboidrato com
 15 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100% de identidade de sequência de aminoácido em qualquer enzima BGL1 e que apresenta atividade de BGL1 como conhecido por uma pessoa versada na técnica. A identidade de sequência pode ser determinada como acima delineado.

As celobio-idrolases CBH1 e CBH2 dentro da mistura de enzi-
 20 mas celulases da presente invenção (isto é, o teor combinado de CBH1 e CBH2) estão presentes em mais ou igual a 55% e menos do que 85% da mistura de celulase primária, dentro da mistura de celulase (isto é, as quantidades de CBH1 e CBH2 compreendem de cerca de 55% a cerca de 85% da mistura de celulase primária, da mistura de enzimas celulases). Dentro
 25 desta faixa de misturas de CBH1 e CBH2, três conjuntos de misturas de destas enzimas de celulase primária, dependentes das diferentes frações do teor de CBH1 e CBH2 combinado em relação às celulases primárias (descrito como o %CBH nas figuras 3A, 3B e 3C), foram identificados como apresentando uma vantagem na realização da hidrólise de uma carga de alimen-
 30 tação lignocelulósica. Estes conjuntos de misturas podem ser definidos pela fração de CBH2 em relação às celobio-idrolases CBH1 e CBH2 (em uma base de quantidade, peso, ou p:vol), onde esta fração é referida como f_{c2} :

$$f_{C2} = CBH1/(CBH1 + CBH2).$$

A fração de EG2 em relação às endoglucanases EG1 e EG2 é referida como f_{E2} :

$$f_{E2} = EG2/(EG1 + EG2).$$

5 A mistura de componente para a primeira, segunda e terceira misturas é traçada nas figuras 3A, 3B e 3C, respectivamente. As três representações dimensionais do espaço de mistura do componente descritas por estas misturas são apresentadas na figura 4.

10 CBH1 e CBH2 compreendendo de cerca de 55% a cerca de 65% da mistura de celulase primária

Quando as celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em mais ou igual a 55% e menos do que 65% das celulases primárias, a fração de celobio-idrolases que é CBH2 (f_{C2}) e a fração de endoglucanases que é EG2 (f_{E2}) são cobertas pela zona 1 da figura 3A. A zona 1 da figura 3A inclui
15 as seguintes três regiões:

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,35 e menores do que 0,45 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,35;

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,45 e menores do que 0,55 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,25; e

20 valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,45 e menores do que 0,55 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,35 e menores do que 0,45.

CBH1 e CBH2 compreendendo de cerca de 65% a cerca de 75% da mistura de celulase primária

Quando as celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em
25 maiores ou iguais a 65% e menores do que 75% das celulases primárias, a f_{C2} e a f_{E2} estão em valores incluídos dentro das zonas 1, 2, e 3 da figura 3B. As zonas 1, 2 e 3 incluem as seguintes regiões:

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,25 e menores do que 0,35 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,05 e menores do que 0,35;

30 valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,35 e menores do que 0,45 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,05 e menores do que 0,55;

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,45 e menores do que 0,65 e

valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,05 e menores do que 0,65; e

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,65 e menores do que 0,75 e

valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,55.

As zonas 2 e 3 da figura 3B incluem as seguintes regiões:

5 valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,25 e menores do que 0,35 e os valores da f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores do que 0,35;

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,35 e menores do que 0,45 e os valores da f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores do que 0,55; e

10 valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,45 e menores do que 0,65 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,55.

A zona 3 da figura 3B inclui as seguintes duas regiões:

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,45 e menores do que 0,55 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,55; e

15 valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,55 e menores do que 0,65 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,35 e menores do que 0,45.

Preferivelmente, a f_{C2} e a f_{E2} incluem valores dentro das zonas 2 e 3 da figura 3B. Mais preferivelmente, a f_{C2} e a f_{E2} incluem valores dentro da zona 3 da figura 3B.

CBH1 e CBH2 compreendendo de cerca de 75% a cerca de 85% da mistura de celulase primária

20 Quando as celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em menos ou igual a 75% e menos do que 85% das celulases primárias, a f_{C2} e a f_{E2} estão em valores incluídos dentro das zonas 1, 2 e 3 da figura 3C. As zonas 1, 2 e 3 incluem as seguintes regiões:

25 valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,35 e menores do que 0,45 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,05 e menores do que 0,25;

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,45 e menores do que 0,55 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,65; e

30 valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,55 e menores do que 0,65 e valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,35.

As zonas 2 e 3 incluem as seguintes três regiões:

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,35 e menores do que 0,45 e

valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,25;

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,45 e menores do que 0,55 e

valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,55; e

valores da f_{C2} maiores ou iguais a 0,55 e menores do que 0,65 e

5 valores da f_{E2} maiores ou iguais a 0,15 e menores do que 0,25.

A zona 3 define uma região única incluindo os valores da f_{C2} entre 0,45 e 0,55 e valores da f_{E2} entre 0,15 e 0,25.

Preferivelmente, a f_{C2} e a f_{E2} incluem valores dentro das zonas 2 e 3 da figura 3C. Mais preferivelmente, a f_{C2} e a f_{E2} incluem valores dentro da
10 zona 3 da figura 3C.

A fração ou porcentagem de cada componente de celulase dentro da mistura de celulase é determinada mediante o uso dos métodos do Exemplo 3.

Portanto, a presente invenção fornece um mistura de enzimas e
15 um processo para a hidrólise enzimática de uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada em açúcares solúveis compreendendo a hidrolisação da carga de alimentação pré-tratada com a mistura de enzimas. A mistura de enzimas celulasas compreende uma mistura de celulase primária de celobio-idrolases CBH1 e CBH2 e endoglucanases EG1 e EG2. As celobio-idrolases
20 CBH1 e CBH2 estão presentes em um teor combinado maior ou igual a 55% e menor do que 85% da mistura de celulase primária. As CBH2 estão presentes em um fração, definida por f_{C2} , em relação às celobio-idrolases CBH1 e CBH2, e as EG2 estão presentes em uma fração, definida por f_{E2} , em relação às endoglucanases EG1 e EG2, em que

- 25 (i) quando ditas celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em mais ou igual a 55% e menos do que 65% das celulasas primárias, dita f_{C2} e dita f_{E2} estão em valores incluídos dentro da zonas 1 da figura 3A;
- (ii) quando ditas celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em mais ou igual a 65% e menos do que 75% das celulasas primárias, dita f_{C2} e
30 dita f_{E2} estão em valores incluídos dentro das zonas 1, 2, e 3 da figura 3B; e
- (iii) quando ditas celobio-idrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em mais

ou igual a 75% e menos do que 85% das celulases primárias, dita f_{C2} e dita f_{E2} estão em valores incluídos dentro das zonas 1, 2, e 3 da figura 3C.

A mistura de enzimas celulases da invenção é usada para a hidrólise enzimática de uma "carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada". Uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada é um material de origem vegetal que, antes do pré-tratamento, contém pelo menos 20% de celulose (peso seco) e pelo menos 12% lignina (peso seco), e que foi submetido aos processos físicos e/ou químicos tornar a fibra mais acessível e/ou receptiva às ações de enzimas celulolíticas.

Após o pré-tratamento, a carga de alimentação lignocelulósica pode conter mais do que cerca de 20% de celulose e mais do que cerca de 12% de lignina. Em uma modalidade, a carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada contém mais do que cerca de 20% de celulose e mais do que cerca de 10% de lignina.

As cargas de alimentação lignocelulósicas que podem ser utilizadas na invenção incluem, mas não são limitados a eles, resíduos agrícolas tais como forragem de milho, palha de trigo, palha de cevada, palha de arroz, palha de aveia, palha de canola e palha de soja; resíduos do processo fibroso tais como fibra de milho, polpa de beterraba açucareira, finos e refugos de moinho de polpa ou bagaço de cana de açúcar; resíduos de área florestal tais como madeira de álamo, outras madeiras de lei, madeira macia e serragem; ou pastos tais como capim flexível, miscanthus, capim de corda, e reed canary grass.

A carga de alimentação lignocelulósica pode ser primeiro submetida a redução de tamanho por métodos incluindo, mas não limitado a estes, moagem, trituração, agitação, corte em pedaços, compressão/expansão, ou outros tipos de ação mecânica. A redução de tamanho por ação mecânica pode ser executada por qualquer tipo de equipamento adaptado para o propósito, por exemplo, mas não limitado a este, um moinho de martelo.

Exemplos não limitativos de processos de pré-tratamento inclu-

em o tratamento químico de uma carga de alimentação lignocelulósica com ácido sulfúrico ou sulfuroso, ou outros ácidos; amônia, cal, hidróxido de amônio, ou outras bases; etanol, butanol, ou outros solventes orgânicos; ou água pressurizada (Ver as Patentes U.S. n^{os} 4.461.648, 5.916.780, 6.090.595, 6.043.392, 4.600.590, Weil e outros (1997) e Öhgren, K., e outros (2005); que são aqui incorporadas por referência).

O pré-tratamento pode ser realizado para hidrolisar a hemicelulose, ou uma parte desta, que está presente na carga de alimentação lignocelulósica nos açúcares monoméricos, por exemplo, xilose, arabinose, manose, galactose, ou uma combinação das mesmas. Preferivelmente, o pré-tratamento é realizado de modo que a hidrólise quase completa da hemicelulose e uma pequena quantidade de conversão de celulose em glicose ocorre. Durante o pré-tratamento, tipicamente uma concentração de ácido na pasta fluida aquosa de cerca de 0,02% (p/p) a cerca de 2% (p/p), ou qualquer quantidade entre estas, é usada para o tratamento da carga de alimentação lignocelulósica. Preferivelmente, o ácido usado durante o pré-tratamento é ácido sulfúrico.

A carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada pode ser processada após o pré-tratamento, mas antes da hidrólise enzimática por qualquer uma das diversas etapas, tais como diluição com água, lavagem com água, tamponamento, filtração ou centrifugação, ou uma combinação destes processos, como é familiar para aqueles versados na técnica.

A carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada é logo depois submetida à hidrólise enzimática. Pelo termo "hidrólise enzimática", quer dizer um processo pelo qual as enzimas celulasas atuam na celulose para converter totalmente ou uma parte desta em açúcares solúveis. Os açúcares solúveis significam incluir monômeros e oligômeros de hexose solúveis em água de até seis unidades monoméricas que são derivadas da porção de celulose da carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada. Exemplos de açúcares solúveis são glicose, celobiose, celodextrinas ou misturas destes. Preferivelmente, os açúcares solúveis são predominantemente celobiose e glicose. Em uma modalidade mais preferida, os açúcares solúveis são pre-

dominantemente glicose.

O processo de hidrólise enzimática preferivelmente converte cerca de 80% a cerca de 100% da celulose em açúcares solúveis, ou qualquer faixa entre esta. Mais preferivelmente, o processo de hidrólise enzimática converte cerca de 90% a cerca de 100% da celulose em açúcares solúveis, ou qualquer faixa entre esta. Na modalidade mais preferida, o processo de hidrólise enzimática converte cerca de 98% a cerca de 100% da celulose em açúcares solúveis, ou qualquer faixa entre esta.

A hidrólise enzimática usando a mistura de celulase pode ser hidrólise por batelada, hidrólise contínua, ou uma combinação das mesmas. A hidrólise pode ser agitada, não misturada, ou uma combinação das mesmas.

A hidrólise enzimática é preferivelmente realizada em uma temperatura de cerca de 45°C a cerca de 75°C, ou qualquer quantidade entre estas, e um pH de cerca de 3,5 a cerca de 7,5, ou qualquer quantidade entre estas. A concentração inicial de celulose no reator de hidrólise, antes de começar a hidrólise, é preferivelmente de cerca de 4% (p/p) a cerca de 15% (p/p), ou qualquer quantidade entre estas. A dosagem combinada de todas as enzimas de celulase primária pode ser de cerca de 5 a cerca de 45 mg de proteína por grama de celulose, ou qualquer quantidade entre estas. A hidrólise pode ser realizada durante um período de tempo de cerca de 12 horas a cerca de 200 horas, ou qualquer quantidade entre estas. Preferivelmente, a hidrólise é realizada durante um período de 15 horas a 100 horas. Deve ser observado que as condições de reação não significam limitar a invenção de qualquer maneira e podem ser ajustadas como desejável por aqueles versada na técnica.

A hidrólise enzimática é tipicamente realizada em um reator de hidrólise. As enzimas de celulase primária são adicionadas na carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada (também referida como o "substrato") antes, durante ou após a adição do substrato ao reator de hidrólise.

Preferivelmente, as celulasas primárias são produzidas em uma ou mais fermentações de cultura submersas em líquido e separadas das

células no final da fermentação. As células podem ser separadas das celula-
ses por filtração, centrifugação, ou outros processos familiares para aqueles
versados na técnica. A fração contendo celulase livre de célula pode depois
ser concentrada (por exemplo, através da ultrafiltração), conservada e/ou
5 estabilizada antes do uso. Alternativamente, as celulasas primárias não são
separadas das células, mas são adicionadas à hidrólise enzimática com as
células.

A mistura de celulase pode ser uma solução aquosa de proteína
em água, uma pasta fluida de proteína em água, um pó sólido ou grânulo, ou
10 um gel. A mistura compreendendo enzimas celulasas pode incluir aditivos
tais como tampões, detergentes, estabilizantes, cargas, ou outros tais aditi-
vos familiares para aqueles versados na técnica.

Preferivelmente, as celulasas primárias são expressas a partir
das sequências de codificação dos fungos. Nesta modalidade, as sequên-
15 cias de codificação devem ser de qualquer fonte fúngica. Os termos "fungo",
"fungos", "fúngico", "*Ascomycotina*", "*Basidiomycotina*" e termos relaciona-
dos (por exemplo, "ascomicetos" e "basidiomicetos") e significam incluir a-
queles organismos definidos como tais em *The Fungi: An Advanced Treatise*
(GC Ainsworth, FK Sparrow, COMO Sussman, eds.; Academic Press 1973).

20 Qualquer fonte de enzimas celulasas pode ser usada na prática
da invenção. As sequências de codificação das celulasas da invenção são
preferivelmente de *Ascomycotina* ou *Basidiomycotina*. Por exemplo, as se-
quências de codificação são dos gêneros selecionados de *Trichoderma ssp.*,
Aspergillus ssp., *Hypocrea ssp.*, *Humicola ssp.*, *Neurospora ssp.*, *Orpinomy-*
25 *ces ssp.*, *Gibberella ssp.*, *Emericella ssp.*, *Chaetomiun ssp.*, *Fusarium ssp.*,
Penicillium ssp., *Magnaporthe ssp.*, e *Phanerochaete ssp.* Preferivelmente,
as sequências de codificação para as celulasas primárias são de *Trichoder-*
ma reesei.

30 As celulasas primárias da invenção podem ser clonadas e ex-
pressas em um micro-organismo conhecido daqueles versada na técnica
como um hospedeiro de expressão, tal como uma bactéria ou um fungo.
Preferivelmente, o micro-organismo é um fungo. A construção genética pode

ser introduzida no micróbio hospedeiro por qualquer número de métodos conhecidos por uma pessoa versada na técnica de transformação microbiana, incluindo, mas não-limitada a estes, tratamento de células com CaCl_2 , electroporação, bombardeio biolístico, fusão mediada por PEG de protoplastos (por exemplo, White e outros, WO 2005/093072, que é aqui incorporado por referência).

Todas as celulasas primárias podem ser expressas a partir de uma cepa de um organismo. Alternativamente, as celulasas primárias podem ser expressas individualmente ou em subgrupos de diferentes cepas de diferentes organismos. Também é contemplado que as celulasas primárias podem ser expressas individualmente ou em subgrupos de diferentes cepas de um único organismo, tais como de diferentes cepas de *Trichoderma reesei*. Preferivelmente, todas as celulasas são expressas a partir de uma única cepa de *Trichoderma reesei*.

As celulasas primárias são preferivelmente partes de um sistema de celulase total produzido pelo(s) organismo(s) de expressão. Em uma modalidade, as celulasas primárias são as únicas enzimas celulasas do sistema de celulase. Em uma outra modalidade, as celulasas primárias são partes de um sistema de celulase que inclui β -glucosidase.

As celulasas primárias podem ser partes de um sistema de celulase total que inclui a secretoma de *Trichoderma reesei*. Pelo termo "secretoma", significa todas as proteínas secretadas extracelularmente no meio de crescimento por um micro-organismo específico. Em uma modalidade preferida, as celulasas primárias são partes de um sistema de celulase total que inclui a β -glucosidase BGL1 de *Trichoderma reesei* e a secretoma de *Trichoderma reesei*.

Os açúcares solúveis produzidos pela hidrólise enzimática podem ser fermentados por micróbios. Os produtos da fermentação podem incluir quaisquer produtos desejados que gerem o valor à usina de fermentação. Os produtos de fermentação preferidos são etanol, butanol e ácido láctico, todos dos quais possuem grandes mercados e são produzidos eficientemente por muitos micróbios. Para a produção de etanol, a fermentação

pode ser realizada por um ou mais do que um micróbio que é capaz de fermentar os açúcares em etanol. Por exemplo, a fermentação pode ser realizada pela levedura de *Saccharomyces* recombinante que foi planejada para fermentar glicose, manose, galactose e xilose em etanol, ou glicose, manose, galactose, xilose e arabinose em etanol. As leveduras recombinantes que podem fermentar xilose em etanol são descritas na Patente U.S. nº 5.789.210 (que é aqui incorporada por referência). A levedura produz um caldo de fermentação que compreende etanol em uma solução aquosa. Para a produção de ácido láctico, a fermentação pode ser realizada por um micróbio que fermenta os açúcares em ácido láctico.

Em uma modalidade da invenção, a mistura de enzimas celulases é produzida mediante a expressão das celulases primárias de um micro-organismo em valores de pH acidicos. Preferivelmente, os valores de pH estão entre cerca de 2 e cerca de 5. Por exemplo, o pH da fermentação pode ser cerca de 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 ou 5,0, ou qualquer pH entre estes.

As misturas de enzima da invenção são de composição muito diferente do que aquelas descritas na técnica anterior para a hidrólise de celulose. As misturas de celulase primária da invenção são composições significativamente diferentes de um "Benchmark Blend", uma composição de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 de 57%, 29%, 7%, 7%, respectivamente. As melhores misturas são traçadas nas figuras 3A, 3B e 3C e o Benchmark Blend é indicada onde ocorre no espaço de mistura traçado na figura 3D. As representações tridimensionais do espaço de mistura do componente descritas por estas zonas são mostradas na figura 4. As misturas de enzima da presente invenção possuem atividade superior do que aquelas descritas na técnica anterior. As zonas 1, 2 e 3 das figuras apresentam aumentos de atividade de 10% ou mais quando comparadas com a Benchmark Blend. As zonas 2 e 3 apresentam aumentos de atividade de 13% ou mais quando comparadas à Benchmark Blend. As misturas definidas pela zona 3 apresentam aumentos de 16% mais em relação à Benchmark Blend.

A forma irregular das zonas traçadas das figuras 3A, 3B e 3C

não foi prevista e indica regiões de atividade exagerada dentro do espaço de mistura inteiro. A mistura de celulase da invenção define um espaço que é mais complicado do que pode ser considerado pelo trabalho anterior usando substratos padrão ou misturas de enzima de menos do que quatro celulas primárias.

Os últimos esforços otimizaram as misturas tipicamente empregadas em misturas ternárias traçadas em gráfico em um diagrama triangular (conforme Baker e outros, 1998). Tais esforços caíram sobre os ângulos, bordas, ou superfícies do espaço, e assim estão distantes do ideal efetivo.

A presente invenção será ainda ilustrada nos exemplos que seguem.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Purificação das celulas primárias CBH1, CBH2, EG1 e EG2 da celulase de *Trichoderma reesei*

Uma cepa de *Trichoderma reesei* foi desenvolvida em fermentação líquida submersa sob condições que induzem a produção de celulase como conhecido por aqueles versados na técnica. A mistura bruta de proteínas de *Trichoderma* foi secretada pelas células no caldo de fermentação. As células fúngicas foram removidas do caldo de fermentação pela filtração através de um filtro de microfibras de vidro contendo um leito de filtro Harborlite. As celulas primárias (CBH1, CBH2, EG1, EG2) foram separadas do filtrado bruto pela cromatografia de troca de ânion usando uma coluna de DEAE-Sepharose como descrito por Bhikhabhai e outros (1984). Esta etapa isolada EG1 e EG2. As CBH1 e CBH2 foram depois mais adiante purificadas por cromatografia por afinidade de p-aminofenil-1-tio- β -D-celobiosida como relatado em Piyachomkwan e outros (1997, 1998). Os componentes de celulase purificados foram concentrados e o tamponante trocado em citrato de sódio 50 mM, pH 5,0 usando uma célula de ultrafiltração agitada (Amicon) e uma membrana de polietersulfona 10 kDa NMWL.

Exemplo 2: Medição da concentração e pureza das celulas primárias

As concentrações de proteína foram determinadas quimicamente usando o método de Bradford e outros (1976). As amostras de cada prote-

ina purificada foram separadas por SDS-PAGE e visualizadas pós-eletroforéticamente pela mancha de Commassie Blue como mostrado na figura 1, painel A. Para cada componente purificado, a intensidade da mancha de cada faixa foi quantificada pela densiometria de varredura usando um sistema de formação de imagem Chemigenius2 (Syngene). A pureza relativa foi calculada pela divisão da intensidade de faixa para cada componente pela intensidade total da mancha medida para todas as faixas na mesma passagem sobre o gel. A EG2 que carece de um módulo de ligação ao carboidrato estava presente em quantidades de traço, mas não foi considerada um contaminante nesta preparação de enzima. A pureza relativa de CBH1 e CBH2 foi de >95% enquanto que para as EG1 e EG2 foi de >90 %.

Para demonstrar que cada preparação de componente foi desprovida de celulasas primárias contaminantes, as CBH1, CBH2, EG1, EG2 purificadas foram analisadas por Western blotting usando antissoro policlonal específico do componente de coelho (figura 1, painel B). As proteínas foram separadas por 10% SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) em 100 V durante 1 h usando um Mini Trans-Blot® Cell da BioRad. Western blotting foi executado usando o método de Birkett e outros. O antissoro policlonal específico do componente foi gerado usando peptídeos sintéticos, as sequências dos quais se basearam na sequência de aminoácido primária de CBH1, CBH2, EG1 ou EG2 de *Trichoderma reesei*, como conhecido daqueles versados na técnica.

Estes exemplos demonstraram que os métodos de purificação usados produziram CBH1, CBH2, EG1 e EG2 substancialmente puras. Isto também demonstrou a especificidade deste antissoro para cada um destes componentes de celulase primária.

Exemplo 3: Determinação das concentrações relativas de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 em Celulase de *Trichoderma*

As concentrações relativas de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 em celulase de *Trichoderma reesei* foram determinadas por ELISA.

Padrões de componente de celulase e purificado foram diluídos de 1 a 100 µg/ml em salina tamponada de fosfato, pH 7,2 (PBS) e incubados

durante a noite a 4°C em placas de microtítulo (Costar EIA – ligação elevada). Estas placas foram lavadas com PBS contendo 0,1% Tween 20 (PBS/Tween) e depois incubadas em PBS contendo 1% albumina de soro bovino (PBS/BSA) durante 1 h em temperatura ambiente. As cavidades de microtítulo bloqueados foram lavados com PBS/Tween. O antissoro policlonal de coelho para CBH1, CBH2, EG1 e EG2 foi diluído em PBS/BSA, adicionado para separar as placas de microtítulo e incubado durante 2 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com um anticorpo anticoelho de cabra acoplado com peroxidase de rábano picante durante 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem, tetrametilbenzidina foi adicionado em cada placa e incubado durante 1 h em temperatura ambiente.

A absorvência em 360 nm foi medida em cada cavidade e convertida em concentração de proteína usando os padrões de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 desenvolvidos no Exemplo 2. A concentração relativa de cada componente foi calculada pela divisão destas concentrações de proteína pela concentração total de CBH1, CBH2, EG1 e EG2.

A composição relativa de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 na celulase de *Trichoderma* foi 57 %:29 %:7 %:7%, respectivamente (figura 2). Isto será aqui referido como nosso Benchmark Blend. Esta Blend é de um produto comercial de celulase de *Trichoderma* e é traçado como se segue.

A concentração de CBHs em relação ao conjunto inteiro de celulases primárias (% de CBH) é $57\% + 29\% = 86\%$. Isto se aplica ao conjunto na figura 3D, que é de 85% a 95% de CBHs. As outras figuras são figura 3A, com %CBH = 55% a 65%, figura 3B, com %CBH = 65% a 75% e figura 3C com %CBH = 75% a 85 %.

A concentração de CBH2 em relação a todas as CBH (f_{c2}) é $29\% / (57\% + 29\%) = 0,337$.

A concentração de EG2 em relação a todas as POR EXEMPLO, primárias (f_{E2}) é $7\% / (7\% + 7\%) = 0,5$.

A celulase das cepas de *Trichoderma* que não secretam CBH1 (CBH1 nula), CBH2 (CBH2 nula), EG1 (EG1 nula) ou EG2 (EG2 nula) também foi analisada para demonstrar que cada ELISA detectou CBH1, CBH2,

EG1 ou EG2 especificamente (figura 2).

Exemplo 4: Medição da atividade de hidrólise de celulose de misturas de celulase primária em uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada.

Uma mistura de celulasas primárias com nossas relações Benchmark CBH1, CBH2, EG1 e EG2 do exemplo 3 foi comparada com as misturas com diferentes composições. Estas misturas de celulasas primárias foram testadas em um ensaio de 0,25 ml de hidrólise de celulose misturada. As misturas de celulase foram diluídas em tampão de citrato contendo 0,5% benzoato de sódio, complementadas com uma preparação de β -glucosidase de *Aspergillus niger* e incubadas com palha de trigo pré-tratado com ácido. O pré-tratamento foi realizado como por Foody, Patente U.S. nº 4.461.648. A incubação foi em 50°C durante 24 h e o nível de conversão de celulose alvo foi maior do que 70 %. A atividade de enzima foi calculada mediante a determinação da quantidade de enzima requerida para alcançar o nível de conversão de celulose alvo e normalização daquela requerida para a mistura de celulase Benchmark.

A incerteza dos valores normalizados é na ordem de $\pm 0,04$, indicando que um valor 10% acima que o observado para o ponto de referência (isto é, um valor normalizado de 1,10) pode ser dito de ser significativamente maior do que o ponto de referência. Uma média pesada através do espaço de mistura tridimensional (espaço com as dimensões f_{C2} , f_{E2} , e %CBH) foi aplicada para facilitar os dados de atividade. Os dados de atividade normalizados para um dado ponto (as coordenadas deste ponto são $f_{C2} = x$, $f_{E2} = y$, %CBH = z) foram divididos proporcionalmente com seus seis pontos mais estritamente próximos com as seguintes coordenadas: $x + 0,1$, y , z ; $x - 0,1$, y , z ; x , $y + 0,1$, z ; x , $y - 0,1$, z ; x , y , $z + 10\%$; e x , y , $z - 10\%$. O ponto em questão foi dado uma pesagem $w = 1,00$ e os seis pontos próximos foram a cada um dado uma pesagem de $w = 0,15$ na seguinte fórmula para a média ponderada (x_w): $x_w = \sum w_i x_i / \sum w_i$ onde o subscrito i significa uma contagem variável para somar o total de 7 pontos descritos acima e x_i e w_i indica a atividade normalizada e pesagem do ponto i^{th} respectivamente.

Para representar estes resultados graficamente, a atividade de

enzima é mostrada nas figuras 3A, 3B, 3C, ou 3D como descrita no exemplo 3 e ilustrada na Tabela 1.

Tabela 1: Produção de glicose normalizada pelas misturas de celulase primária

Mistura	% CBH1	% CBH2	% EG1	% EG2	% CBH*	Figura	f_{C2}^{**}	f_{E2}^{***}	Atividade
Ben- chmark Blend	57%	29%	7%	7%	86%	1D	0,333	0,500	1,00
1	36%	23%	37%	4%	59%	1A	0,396	0,087	1,08
2	36%	23%	33%	8%	59%	1A	0,396	0,187	1,11
3	36%	23%	29%	12%	59%	1A	0,396	0,287	1,10
4	30%	29%	37%	4%	59%	1A	0,496	0,087	1,09
5	30%	29%	33%	8%	59%	1A	0,496	0,187	1,11
6	30%	29%	29%	12%	59%	1A	0,496	0,287	1,09
7	30%	29%	25%	16%	59%	1A	0,496	0,387	1,11
8	24%	35%	37%	4%	59%	1A	0,596	0,087	1,06
9	24%	35%	33%	8%	59%	1A	0,596	0,187	1,06
10	24%	35%	29%	12%	59%	1A	0,596	0,287	1,04
11	24%	35%	25%	16%	59%	1A	0,596	0,387	1,06
12	62%	7%	28%	3%	69%	1B	0,096	0,087	0,90
13	62%	7%	25%	6%	69%	1B	0,096	0,187	0,91
14	62%	7%	22%	9%	69%	1B	0,096	0,287	0,91
15	56%	14%	28%	3%	69%	1B	0,196	0,087	1,05
16	56%	14%	25%	6%	69%	1B	0,196	0,187	1,08
17	56%	14%	22%	9%	69%	1B	0,196	0,287	1,08
18	56%	14%	19%	12%	69%	1B	0,196	0,387	1,02
19	49%	20%	28%	3%	69%	1B	0,296	0,087	1,15
20	49%	20%	25%	6%	69%	1B	0,296	0,187	1,14
21	49%	20%	22%	9%	69%	1B	0,296	0,287	1,13
22	49%	20%	19%	12%	69%	1B	0,296	0,387	1,08
23	49%	20%	16%	15%	69%	1B	0,296	0,487	1,08
24	49%	20%	13%	18%	69%	1B	0,296	0,587	1,06
25	42%	27%	28%	3%	69%	1B	0,396	0,087	1,14
26	42%	27%	25%	6%	69%	1B	0,396	0,187	1,14

Mistura	% CBH1	% CBH2	% EG1	% EG2	% CBH*	Figura	f _{c2} **	f _{E2} ***	Atividade
27	42%	27%	22%	9%	69%	1B	0,396	0,287	1,13
28	42%	27%	19%	12%	69%	1B	0,396	0,387	1,13
29	42%	27%	16%	15%	69%	1B	0,396	0,487	1,14
30	42%	27%	13%	18%	69%	1B	0,396	0,587	1,06
31	42%	27%	10%	21%	69%	1B	0,396	0,687	1,05
32	35%	34%	28%	3%	69%	1B	0,496	0,087	1,11
33	35%	34%	25%	6%	69%	1B	0,496	0,187	1,16
34	35%	34%	22%	9%	69%	1B	0,496	0,287	1,17
35	35%	34%	19%	12%	69%	1B	0,496	0,387	1,17
36	35%	34%	16%	15%	69%	1B	0,496	0,487	1,18
37	35%	34%	13%	18%	69%	1B	0,496	0,587	1,12
38	35%	34%	10%	21%	69%	1B	0,496	0,687	1,07
39	28%	41%	28%	3%	69%	1B	0,596	0,087	1,11
40	28%	41%	25%	6%	69%	1B	0,596	0,187	1,14
41	28%	41%	22%	9%	69%	1B	0,596	0,287	1,14
42	28%	41%	19%	12%	69%	1B	0,596	0,387	1,16
43	28%	41%	16%	15%	69%	1B	0,596	0,487	1,15
44	28%	41%	13%	18%	69%	1B	0,596	0,587	1,11
45	28%	41%	10%	21%	69%	1B	0,596	0,687	1,07
46	21%	48%	28%	3%	69%	1B	0,696	0,087	1,07
47	21%	48%	25%	6%	69%	1B	0,696	0,187	1,11
48	21%	48%	22%	9%	69%	1B	0,696	0,287	1,10
49	21%	48%	19%	12%	69%	1B	0,696	0,387	1,10
50	21%	48%	16%	15%	69%	1B	0,696	0,487	1,10
51	14%	55%	28%	3%	69%	1B	0,796	0,087	1,00
52	14%	55%	25%	6%	69%	1B	0,796	0,187	1,02
53	14%	55%	22%	9%	69%	1B	0,796	0,287	1,00
54	14%	55%	19%	12%	69%	1B	0,796	0,387	1,00
55	71%	8%	19%	2%	79%	1C	0,096	0,087	0,90
56	71%	8%	17%	4%	79%	1C	0,096	0,187	0,89
57	64%	15%	19%	2%	79%	1C	0,196	0,087	1,00
58	64%	15%	17%	4%	79%	1C	0,196	0,187	1,05
59	64%	15%	15%	6%	79%	1C	0,196	0,287	1,04
60	56%	23%	19%	2%	79%	1C	0,296	0,087	1,06

Mistura	% CBH1	% CBH2	% EG1	% EG2	% CBH*	Figura	f _{C2} **	f _{E2} ***	Atividade
61	56%	23%	17%	4%	79%	1C	0,296	0,187	1,08
62	56%	23%	15%	6%	79%	1C	0,296	0,287	0,97
63	56%	23%	13%	8%	79%	1C	0,296	0,387	0,92
64	56%	23%	11%	10%	79%	1C	0,296	0,487	0,90
65	56%	23%	9%	12%	79%	1C	0,296	0,587	0,88
66	48%	31%	19%	2%	79%	1C	0,396	0,087	1,10
67	48%	31%	17%	4%	79%	1C	0,396	0,187	1,13
68	48%	31%	15%	6%	79%	1C	0,396	0,287	1,08
69	48%	31%	13%	8%	79%	1C	0,396	0,387	1,03
70	48%	31%	11%	10%	79%	1C	0,396	0,487	1,01
71	48%	31%	9%	12%	79%	1C	0,396	0,587	0,92
72	40%	39%	19%	2%	79%	1C	0,496	0,087	1,09
73	40%	39%	17%	4%	79%	1C	0,496	0,187	1,16
74	40%	39%	15%	6%	79%	1C	0,496	0,287	1,15
75	40%	39%	13%	8%	79%	1C	0,496	0,387	1,13
76	40%	39%	11%	10%	79%	1C	0,496	0,487	1,14
77	40%	39%	9%	12%	79%	1C	0,496	0,587	1,10
78	32%	47%	19%	2%	79%	1C	0,596	0,087	1,08
79	32%	47%	17%	4%	79%	1C	0,596	0,187	1,15
80	32%	47%	15%	6%	79%	1C	0,596	0,287	1,10
81	32%	47%	13%	8%	79%	1C	0,596	0,387	1,04
82	32%	47%	11%	10%	79%	1C	0,596	0,487	1,03
83	32%	47%	9%	12%	79%	1C	0,596	0,587	1,01
84	24%	55%	19%	2%	79%	1C	0,696	0,087	1,00
85	24%	55%	17%	4%	79%	1C	0,696	0,187	1,06
86	24%	55%	15%	6%	79%	1C	0,696	0,287	1,06
87	16%	63%	19%	2%	79%	1C	0,796	0,087	0,95
88	16%	63%	17%	4%	79%	1C	0,796	0,187	0,94
89	16%	63%	15%	6%	79%	1C	0,796	0,287	0,98
90	63%	26%	10%	1%	89%	1D	0,296	0,087	0,92
91	63%	26%	9%	2%	89%	1D	0,296	0,187	0,96
92	63%	26%	8%	3%	89%	1D	0,296	0,287	0,92
93	54%	35%	10%	1%	89%	1D	0,396	0,087	0,96
94	54%	35%	9%	2%	89%	1D	0,396	0,187	1,06

Mistura	% CBH1	% CBH2	% EG1	% EG2	% CBH*	Figura	f _{C2} **	f _{E2} ***	Atividade
95	54%	35%	8%	3%	89%	1D	0,396	0,287	1,00
96	45%	44%	10%	1%	89%	1D	0,496	0,087	1,02
97	45%	44%	9%	2%	89%	1D	0,496	0,187	1,07
98	45%	44%	8%	3%	89%	1D	0,496	0,287	1,05
99	45%	44%	7%	4%	89%	1D	0,496	0,387	0,97
100	36%	53%	10%	1%	89%	1D	0,596	0,087	1,07
101	36%	53%	9%	2%	89%	1D	0,596	0,187	1,08
102	36%	53%	8%	3%	89%	1D	0,596	0,287	0,98
103	36%	53%	7%	4%	89%	1D	0,596	0,387	0,93
104	27%	62%	10%	1%	89%	1D	0,696	0,087	0,86
105	27%	62%	9%	2%	89%	1D	0,696	0,187	0,90
106	27%	62%	8%	3%	89%	1D	0,696	0,287	0,91

* %CBH = %CBH1 + %CBH2

** f_{C2} = CBH2/(CBH1+CBH2)

*** f_{E2} = EG2/(EG1+EG2)

Estes esquemas são mostrados representando misturas de celulase tendo teores de CBH fracionais (%CBH) dentro das seguintes faixas: 55-65% (figura 3A), 65-75% (figura 3B), 75-85% (figura 3C), e 85-95% (figura 3D).

As áreas sombreadas nas figuras 3A, 3B e 3C representam as atividades de hidrólise relativas para misturas com atividade significativamente mais elevada do que a mistura Benchmark. A atividade é 1,10-1,12 na zona 1, que é a atividade de 10% a 12% mais elevada do que a Benchmark Blend. A atividade é 1,13-1,15 na zona 2. Esta é a atividade de 13% a 15% mais elevada do que a Benchmark Blend. A atividade mais elevada de 1,16-1,18 é na zona 3, que é 16% a 18% mais elevada do que a Benchmark Blend. A figura 3A, que abrange de 55% a 65% de CBHs, não possui qualquer mistura com atividade acima de 1,12 e, portanto, apenas inclui valores dentro da zona 1. A figura 3D, que abrange de 85% a 95% de CBHs, não possui qualquer mistura com atividade acima de 1,10.

Existem vários aspectos de interesse para os resultados mostrados nas figuras 3A, 3B, 3C e 3D. Primeiro, existem misturas de celulasas

primárias identificadas com atividade significativamente mais elevada do que a Benchmark Blend, que propriamente dito representa as proporções de celulasas primárias observadas nas em enzimas celulasas típicas comercialmente disponíveis. Isto mostra que é possível produzir misturas de celulase
 5 que são >15% mais potentes do que as misturas correntemente disponíveis. Estas misturas diferem significativamente na composição a partir da Benchmark Blend.

Um segundo ponto é a forma irregular das zonas traçadas. Estas formas irregulares não foram previstas e indicam regiões de atividade exagerada dentro do espaço total de mistura. Os dados experimentais definem um
 10 espaço que é mais complicado do que pode ser considerado pelo trabalho anterior usando substratos modelos ou misturas de enzima de menos do que quatro celulasas primárias.

Um terceiro ponto é que as melhores misturas são composições
 15 significativamente diferentes das misturas da técnica anterior (vide Exemplo 5). Sem ser limitado pela teoria, percebeu-se ser necessário utilizar uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada para a medição da atividade de celulase. Muitos estudos da técnica anterior usaram substratos modelos de celulose pura.

20 Representações tridimensionais do espaço de mistura de componente compreendidas destas zonas são mostradas na figura 4.

Exemplo 5: Mapeamento das composições de celulasas de *Trichoderma*

As composições relativas de dez celulasas de *Trichoderma* para a hidrólise de celulose da literatura científica e de patente foram determinadas mediante a divisão da concentração de proteína relatada de CBH1, C-
 25 BH2, EG1 e EG2 pela qual a soma destes quatro componentes em cada respectiva celulase. Estas celulasas foram depois divididas em grupos baseados em seu percentual de CBH como foi feito para as misturas de celulase primária no Exemplo 4. Estas celulasas foram depois traçadas em gráfico
 30 como uma função de suas f_{C2} e f_{E2} e subsequentemente comparadas com as zonas associadas com uma melhora na atividade de hidrólise de celulose em relação à mistura de componente do ponto de referência. As celulasas

de *Trichoderma* na literatura com CBH < 55% ou CBH > 95% não foram incluídas nesta análise.

Todas as composições publicadas de celulasas primárias se situam bem fora das zonas que produzem a atividade de celulase mais elevada.

Tabela 2: Mapeamento das composições conhecidas na figura 3

Mistura	CBH1 (%)	CBH2 (%)	EG1 (%)	EG2 (%)	CBH (%)	Figura	f_{C2}	f_{E2}
Baker e outros (1998)	60	20	20	0	80	3C	0,25	0
Cytolase (na Patente U.S. nº 5.525.507)	50	14	12	9	75	3C	0,22	0,43
Henrissat e outros (1985)	0	95	5	0	95	3D	1	0
Henrissat e outros (1985)	0	95	0	5	95	3D	1	1
Jeoh e outros (2006)	0	70	0	30	1	3B	1	1
Celloviridin (em Markov e outros, 2005)	50	30	10	10	80	3C	0,38	0,5
Nidetsky e outros (1994)	88,6	0	11,4	0	88,6	3D	0	0
Valjamae e outros (2003)	90,9	0	0	9,1	90,9	3D	0	1
Woodward e outros (1988)	50	25	0	25	75	3B	0,33	1
Woodward e outros (1988)	88	0	0	12	88	3D	0	1

Uma celulase de *Trichoderma* que necessita de EG2 também foi traçada em gráfico na figura 3D. Esta composição continha 61,3% de CBH1, 31,2% de CBH2, 7,5% de EG1, e os valores da f_{C2} e f_{E2} foram 0,337 e 0, respectivamente. Esta composição também se situa fora das zonas que produzem a atividade de celulase mais elevada (vide figuras 3B e 3C).

Exemplo 6: Medição da atividade de hidrólise das misturas de celulase primária sobre a carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada durante um período prolongado.

Uma mistura de celulasas primárias com nossas relações de CBH1, CBH2, EG1 e EG2 Benchmark do Exemplo 3 foi comparada com uma mistura melhorada com uma melhora de atividade de 15% no Exemplo

4 em uma hidrólise prolongada. A mistura melhorada foi composta de 32% Cel7A, 47% Cel6A, 17% Cel7B e 4% Cel5A. Ambas as misturas foram dosadas em 18 mg de enzima por g de celulose e ainda suplementadas com uma preparação de β -glucosidase de *Aspergillus niger* em 100 IU/g de celulose.

As misturas foram incubadas com 25 g/L de celulose em 50 mM de citrato, pH 5,0, contendo 0,5% de benzoato de sódio e 0,01% de Triton X-100 em 50°C durante 56 horas com agitação contínua em 200 rpm. Aliquotas de 0,5 ml foram tomadas nos pontos de tempo indicados na figura 5 e a concentração de glicose na parte solúvel foi avaliada e convertida em uma conversão fracionária. Os dados de conversão foram depois adaptados com uma hipérbole retangular com um termo linear adicional usando a minimização da soma de resíduos quadrados adaptados. A equação foi da seguinte forma: $\text{conversão} = (\text{max} \cdot \text{tempo}) / (\text{meia max} + \text{tempo}) + c \cdot \text{tempo}$. Ambos os conjuntos de dados foram adaptados globalmente com valores max e meio max únicos e um valor repartido da variável c. Erros padrão dos valores de conversão max foram calculados usando um método de comparação modelo (Motulsky and Christopolous, 2003). Um t-teste foi usado para comparar os valores de conversão max com relação às misturas do ponto de referência e otimizadas (supra).

O valor de conversão max para a mistura otimizada foi 0,69, um aumento a mais da conversão max de 0,59 da mistura do ponto de referência. Isto representa um aumento significativo ($P < 0,05$) de 16 %. A conversão destas misturas será mais elevada na presença de componentes adicionais da celulase à parte dos quatro aqui considerados.

Todas as citações são por meio desta incorporadas por referência.

A presente invenção foi descrita com referência a uma ou mais modalidades. No entanto, ficará evidente para as pessoas versadas na técnica que diversas variações e modificações podem ser feitas sem divergir do escopo da invenção como definida nas reivindicações.

LISTAGEM DE REFERÊNCIA

- Baker, J., e outros, "Hydrolysis of cellulose using ternary mixtures of purified cellulases", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72:395-403, (1998).
- 5 Barr, B., e outros, "Identification of two functionally different classes of exo-cellulases", *Biochemistry*, 35:586-592, (1996).
- Berghem, L. and Pettersson, L., "The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose.", *European Journal of Biochemistry*, 37:21-30, (1973).
- 10 Bhikhabhai, R., e outros, "Isolation of Cellulolytic Enzymes from *Trichoderma reesei* QM 9414", *Journal of Applied Biochemistry*, 6:336-345 (1984).
- Birkett, C.R., e outros, "Use of monoclonal antibodies to analyze the expression of a multi-tubulin family", *FEBS Letters*, 187(2):211-218, (1985).
- Boisset, C., e outros, "Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose", *Biotechnology and Bioengineering*, 72:339-345, (2001).
- 15 Bradford, M.M., e outros, "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, (1976).
- 20 Enari, T.M. and Niku-Paavola, M.L., "Assays for Cellulolytic Enzymes: Methods for Measuring Cellulase Activities", In J.N. Abelson and M.I. Simon (Ed/s.), *Methods in Enzymology*, 117-126, San Diego, California: Academic Press, Inc., (1988).
- Henrissat, B., e outros, "Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose", *Bio/Technology*, 3:722-726, (1985).
- 25 Houghton, J., e outros, "Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol", U.S. Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, DOE/SC-0095, (2006).
- Hui, J., e outros, "Characterization of cellobiohydrolase I (Cel7A) glycoforms from
- 30 extracts of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectric focusing and electrospray mass spectrometry", *Journal of Chromatography B*, 752:349-

- 368, (2001).
- Irwin, D., e outros, "Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects", *Biotechnology and Bioengineering*, 42:1002-1013, (1993).
- 5 Kim e outros, "Factorial optimization of a six-cellulase mixture", *Biotechnology and Bioengineering*, 58:494-501, (1998).
- Kubicek, C., "The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation", *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 45:2-22, (1992).
- 10 Motulsky, H, and Christopolous, A., "Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: A practical guide to curve fitting." Oxford University Press, New York, (2004).
- Nidetsky, B., e outros, "Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction.", *Biochemical*
- 15 *Journal*, 298:705-710, (1994).
- Öhgren, K., e outros, "Optimization of Steam Pretreatment of SO₂-Impregnated Corn Stover for Fuel Ethanol Production", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124:1055-1067, (2005)
- Piyachomkwan, K., e outros, "p-Aminophenyl 1-thio- β -D-cellobioside: synthesis and application in affinity chromatography of exo-type cellulases",
- 20 *Carbohydrate Research*, 303:255-259, (1997).
- Piyachomkwan, K., e outros, "Aryl Thioglycoside-Based Affinity Purification of Exo-Acting Cellulases", *Analytical Biochemistry*, 255:223-235, (1998).
- Sheehan, J. and Himmel, M., "Enzymes, Energy, and the Environment: A
- 25 *Strategic Perspective on the U.S. Department of Energy's Research and Development Activities for Bioethanol*", *Biotechnology Progress*, 15:817-827, (1999).
- Tolan, J., "Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass", *Clean Technologies and Environmental Policy*, 3:339-345, (2002).
- 30 Walker, L., e outros, "Engineering cellulase mixtures by varying the mole fraction of *Thermonospora fusca* E5 and E3, *Trichoderma reesei* CBHI and *Caldocellum saccharolyticum* β -glucosidase", *Biotechnology and Bioen-*

- gineering, 42:1019-1028, (1993).
- Weil, J. e outros, "Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 68(1-2):21-40 (1997).
- Wood, T. and McCrae, S., "The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase", *Biochemical Journal*, 171:61-72, (1972).
- Wood, T. and McCrae, S., "Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose", *Advances in Chemistry Series*, 181:181-209, (1979).
- Wood, T., e outros, "The mechanism of fungal cellulase action: Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose", *Biochemical Journal*, 260:37-43.
- Woodward, J., e outros, "The role of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose", *Biochemical Journal*, 255:895-899, (1988).
- Zhang, S., e outros, "Substrate heterogeneity causes the nonlinear kinetics of insoluble cellulose hydrolysis", *Biotechnology and Bioengineering*, 66:35-41, (1999).

Todas as citações são aqui incorporadas por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a hidrólise enzimática de uma carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada em açúcares solúveis, caracterizado pelo fato de que compreende a adição de uma mistura de enzima celulase à carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada a uma temperatura de 50°C e pH 5,0, a dita mistura de enzima celulase compreendendo (a) uma mistura de celulase primária de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 de *Trichoderma reesei* e endoglucanases EG1 e EG2 de *Trichoderma reesei* e (b) uma beta-glicosidase de *Aspergillus niger*, ditas celobiohidrolases CBH1 e CBH2 estando presentes em mais do que ou igual a 55% e menos do que 85% da mistura de celulase primária, dita CBH2 estando presente em uma fração, f_{C2} , que é a razão do conteúdo de CBH2 (em uma base de quantidade, peso, ou p:vol) para o conteúdo combinado de CBH1 e CBH2 da mistura primária de celulase e dita EG2 estando presente em uma fração, f_{E2} , que é a razão do conteúdo de EG2 (em uma base de quantidade, peso, ou p:vol) para o conteúdo combinado de EG1 e EG2 da mistura primária de celulase, em que
- quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é mais do que ou igual a 55% e menos do que 65% das celulases primárias,
- os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,35;
- os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25; ou
- os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45,
- quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é mais do que ou igual a 65% e menos do que 75% das celulases primárias,
- os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,25 e menores

que 0,35 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,35;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,55;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,65; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,65 e menores que 0,75 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55,

quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é mais do que ou igual a 75% e menos do que 85% das celulases primárias,

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,25;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,65; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,55 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,35.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é 65% a 85% das celulases primárias e em que

quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é 65% a 75% das celulases primárias,

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,25 e menores que 0,35 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,35;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores

que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,55; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55; e

quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é 75% a 85% das celulases primárias,

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,55 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é 75% a 85% das celulases primárias e

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,55 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25.

5. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é 65% a 75% das celulases primárias

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,25 e menores que 0,35 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,35;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,55; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,55 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a hidrólise enzimática converte pelo menos 80% da celulose na carga de alimentação lignocelulósica pré-tratada em açúcares solúveis.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreendendo ainda a etapa de fermentação dos açúcares solúveis para produzir etanol, ácido láctico, butanol ou uma combinação dos mesmos.

9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a hidrólise enzimática é realizada com enzimas celulases compreendendo um secretoma de *Trichoderma reesei*.

10. Mistura de enzima celulase, caracterizada pelo fato de que compreende (a) uma mistura de celulase primária de celobiohidrolases

- CBH1 e CBH2 de *Trichoderma reesei* e endoglucanases EG1 e EG2 de *Trichoderma reesei* e (b) uma beta-glicosidase de *Aspergillus niger*, as ditas celobiohidrolases CBH1 e CBH2 estando presentes em mais do que ou igual a 55% e menos do que 85% da mistura de celulase primária, a dita CBH2
- 5 estando presente em uma fração, f_{C2} , que é a razão do conteúdo de CBH2 (em uma base de quantidade, peso, ou p:vol) para o conteúdo combinado de CBH1 e CBH2 da mistura primária de celulase e a dita EG2 estando presente em uma fração, f_{E2} , que é a razão do conteúdo de EG2 (em uma base de quantidade, peso, ou p:vol) para o conteúdo combinado de EG1 e EG2 da
- 10 mistura primária de celulase, em que
- quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é mais do que ou igual a 55% e menos do que 65% das celulases primárias,
- os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores
- 15 que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,35;
- os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25; ou
- 20 os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e
- os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45,
- quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e
- 25 CBH2 na mistura primária de celulase é mais do que ou igual a 65% e menos do que 75% das celulases primárias,
- os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,25 e menores que 0,35 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,35;
- 30 os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,55;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,65; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,65 e menores que 0,75 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55,

quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é mais do que ou igual a 75% e menos do que 85% das celulases primárias,

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,25;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,65; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,55 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,35.

11. Mistura de enzima celulase de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que ditas celobiohidrolases CBH1 e CBH2 estão presentes em 65% a 85% das celulases primárias e em que

quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é 65% a 75% das celulases primárias,

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,25 e menores que 0,35 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,35;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,55; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55; e

quando o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é 75% a 85% das celulases primárias,

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,55 e menores que 0,65 e ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25.

12. Mistura de enzima celulase de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é 75% a 85% das celulases primárias e

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25;

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,55 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25.

13. Mistura de enzima celulase de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,25.

14. Mistura de enzima celulase de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o conteúdo combinado de celobiohidrolases CBH1 e CBH2 na mistura primária de celulase é 65% a 75% das celulases primárias e

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,25 e menores que 0,35 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,35;

- 5 os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,05 e menores que 0,55; ou

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,65 e ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55.

- 10 15. Mistura de enzima celulase de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que

os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,45 e menores que 0,55 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,15 e menores que 0,55; ou

- 15 os ditos valores de f_{C2} são maiores ou iguais a 0,55 e menores que 0,65 e os ditos valores de f_{E2} são maiores ou iguais a 0,35 e menores que 0,45.

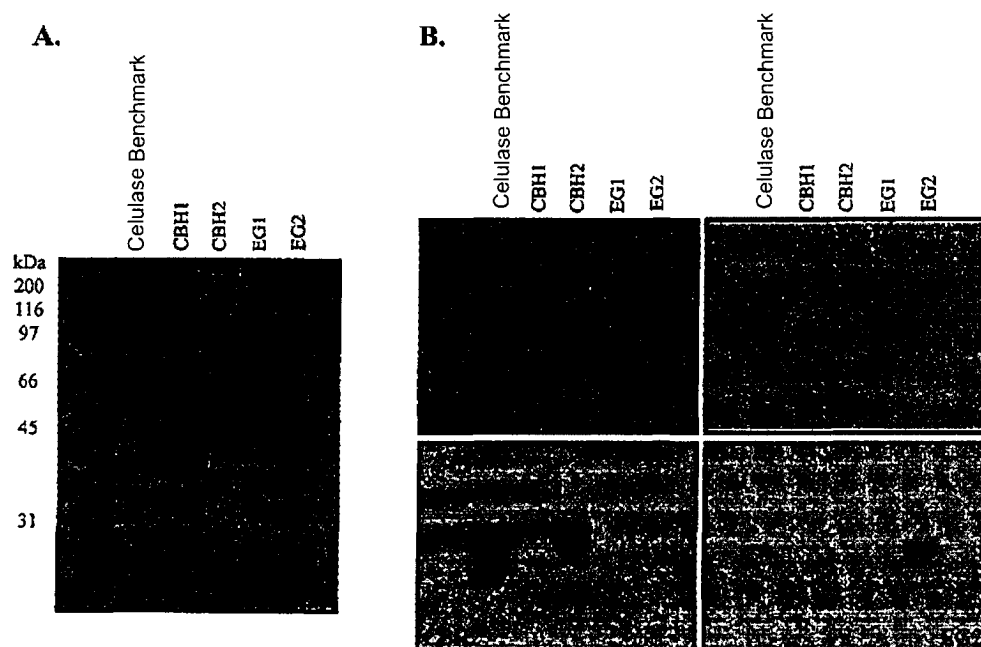


Fig.1

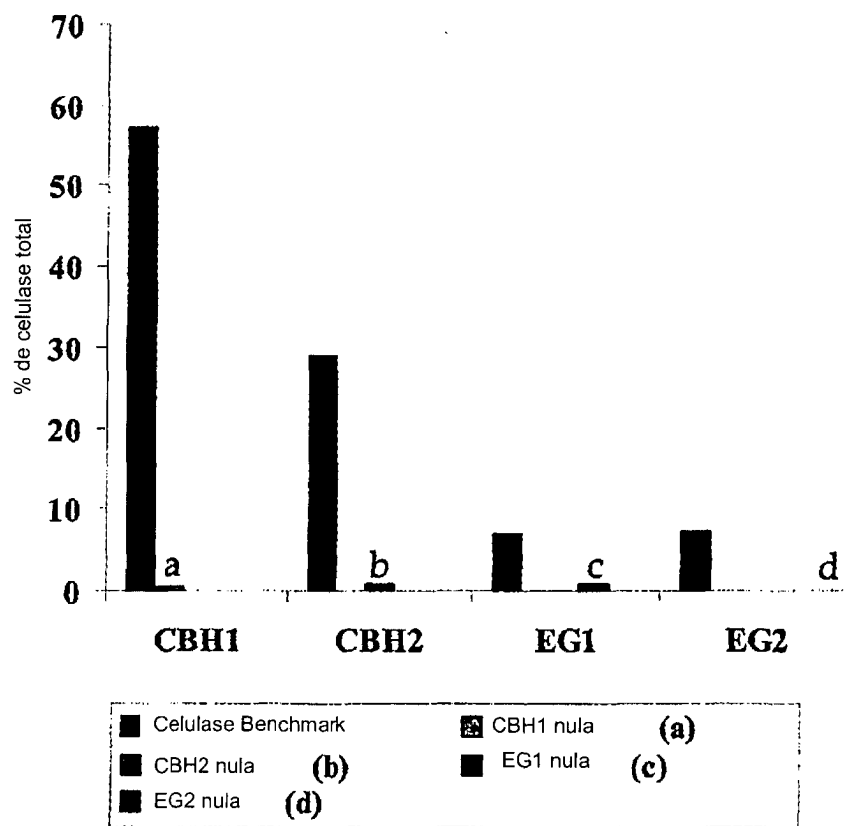


Fig.2

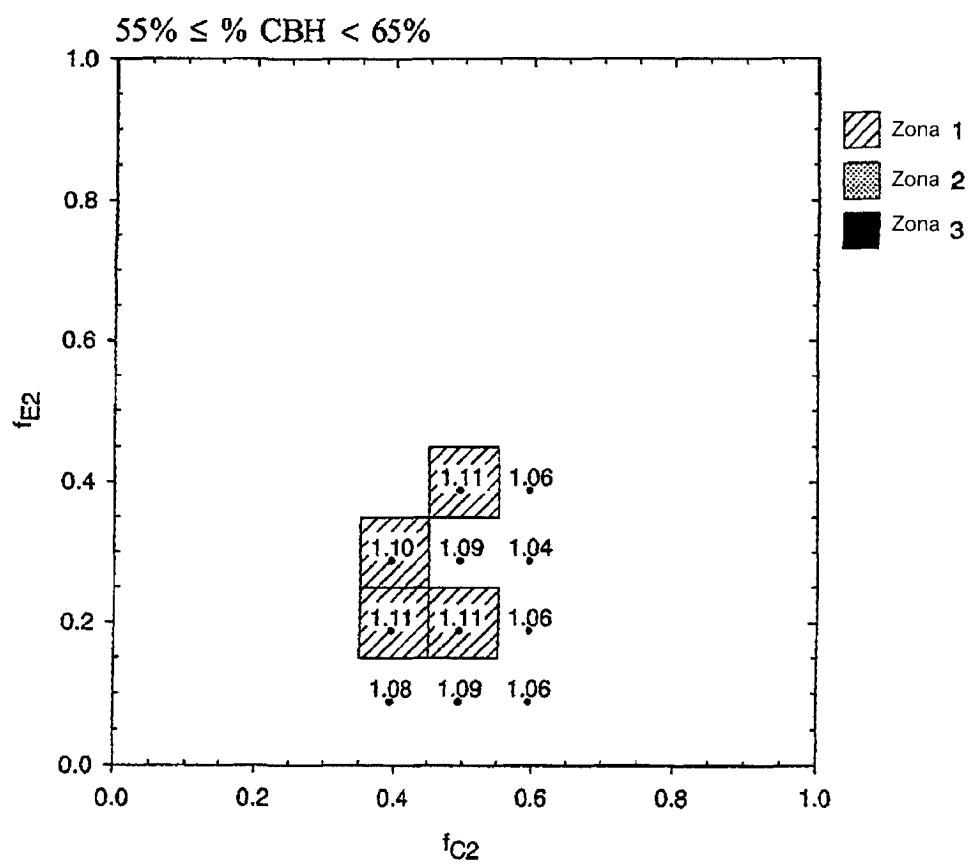


Fig.3A

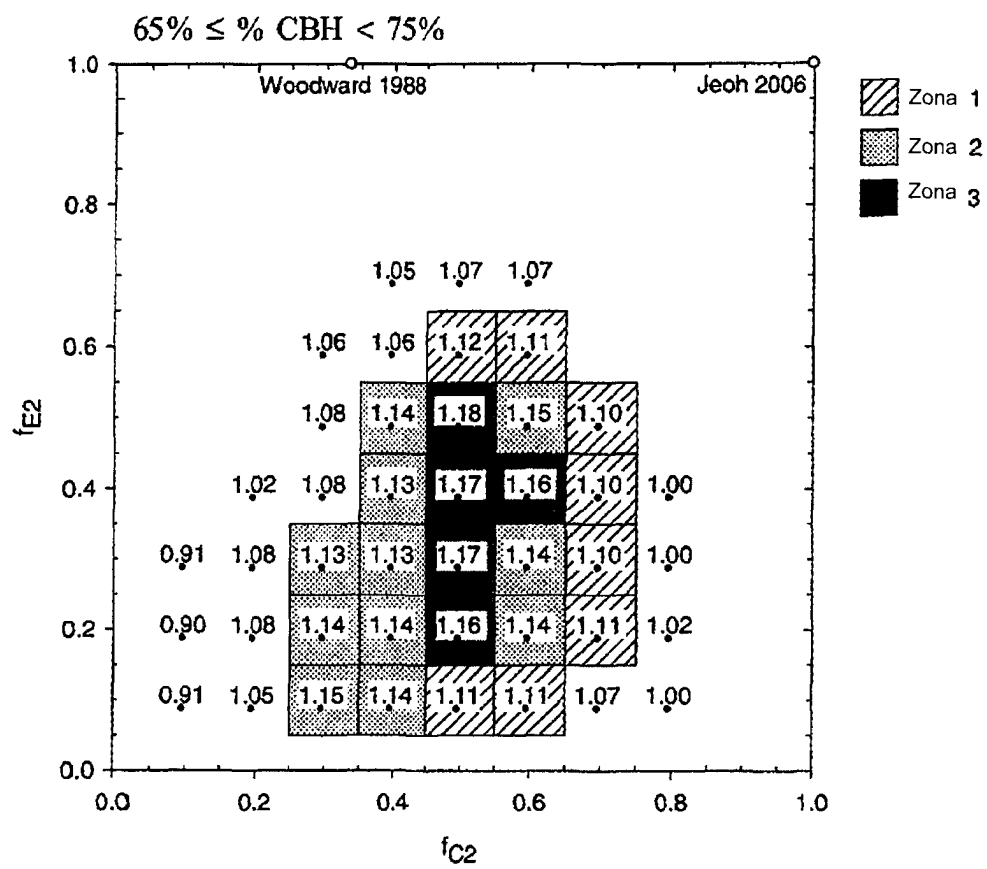


Fig.3B

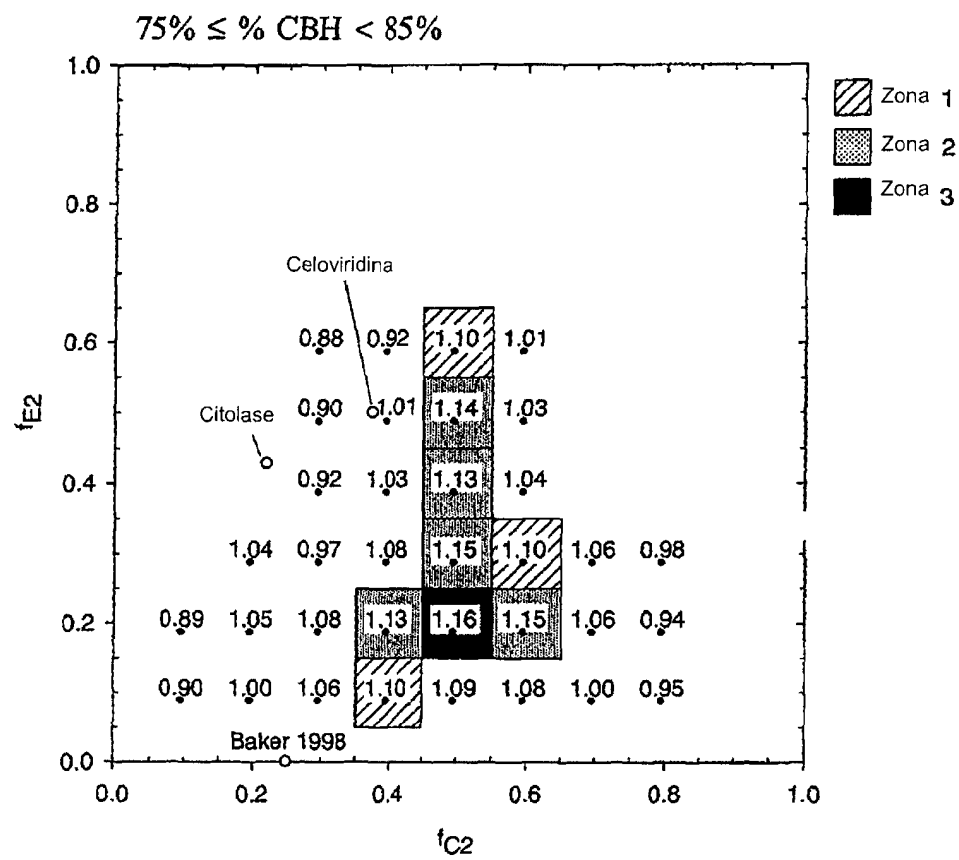


Fig.3C

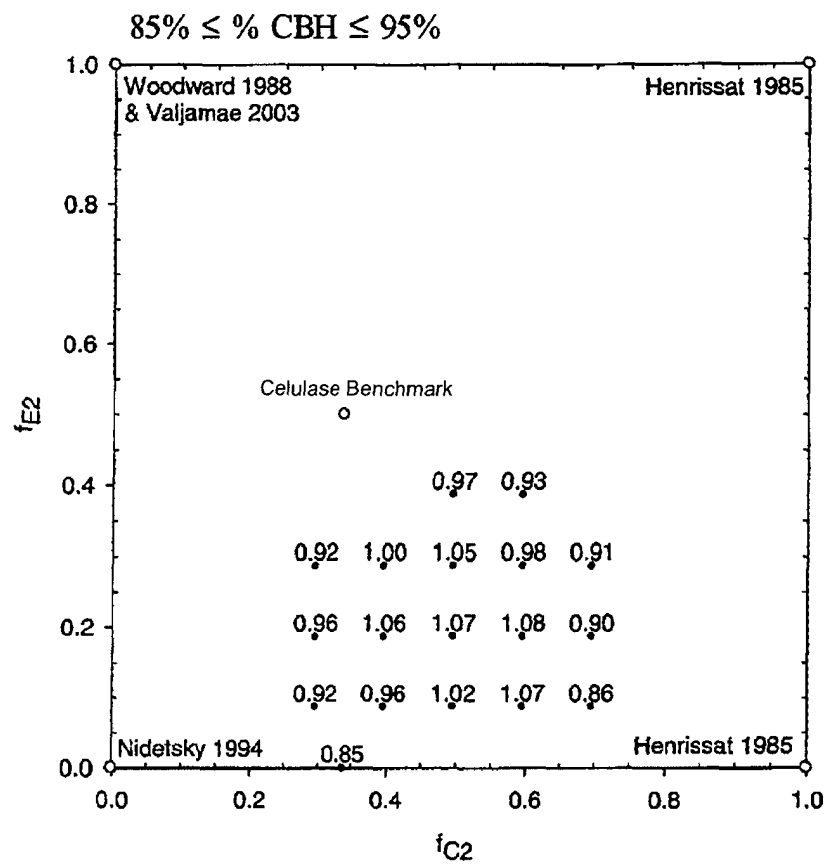


Fig.3D

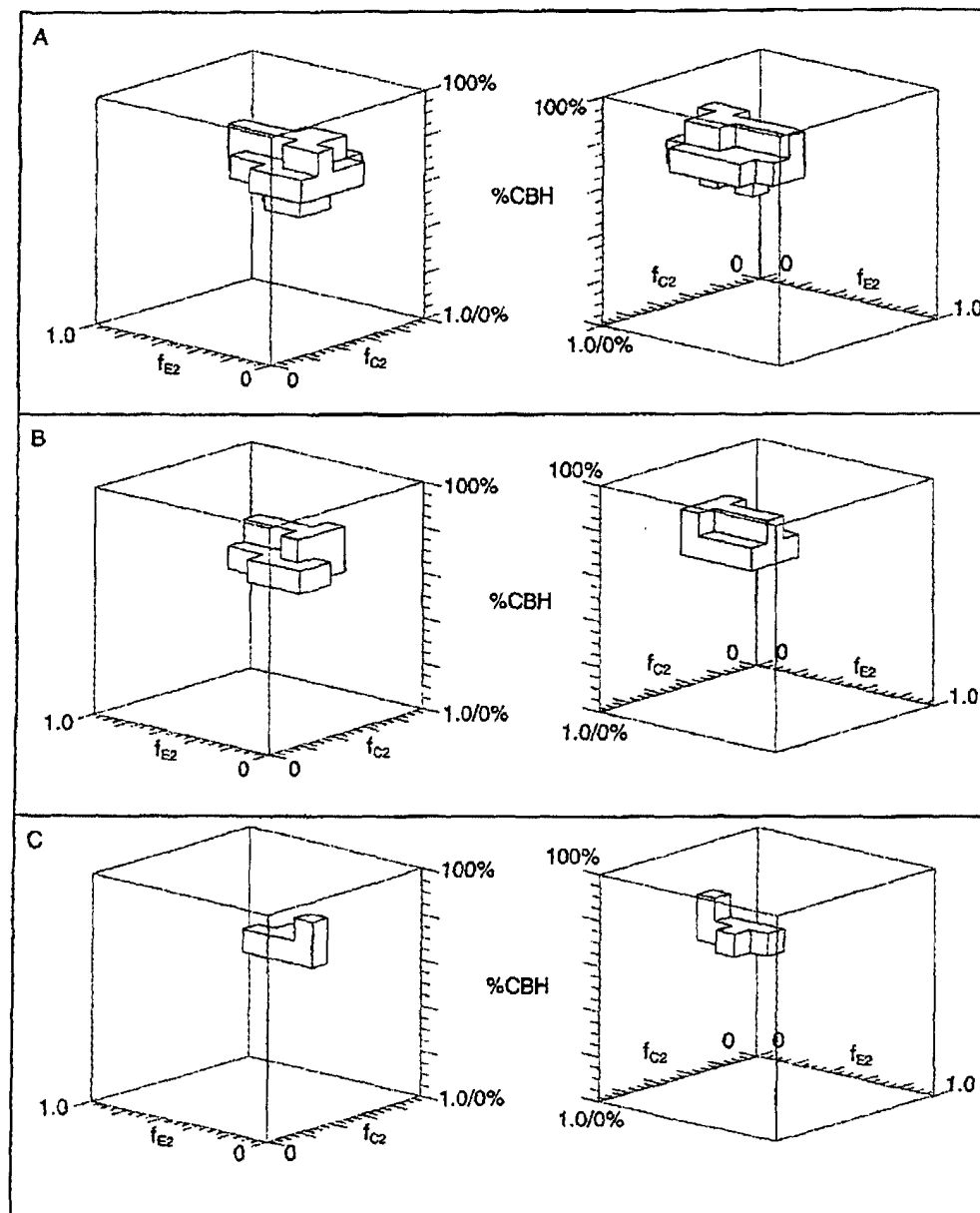


Fig.4

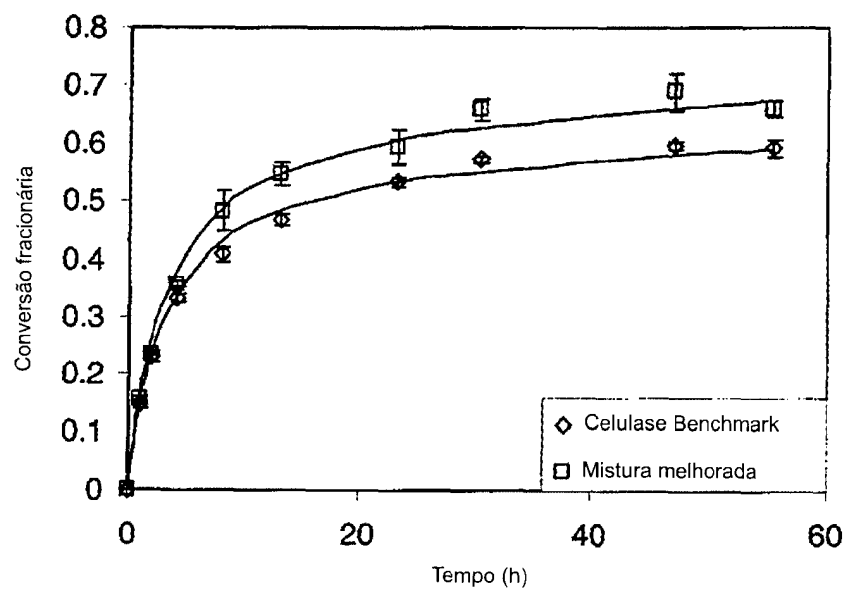


Fig.5