

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

(21) **PI0707893-5 A2**



(22) Data de Depósito: 09/02/2007
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)

(51) *Int.Cl.:*

C12N 9/24
C12N 9/42
C12P 7/06
C12P 19/02
C12P 19/04
C12P 19/12
C12P 5/02
A23K 1/165

(54) Título: **SISTEMAS DE ENZIMA DE TALAROMYCES EMERSONII**

(30) Prioridade Unionista: 10/02/2006 IE S2006/0090

(73) Titular(es): National University of Ireland, Galway

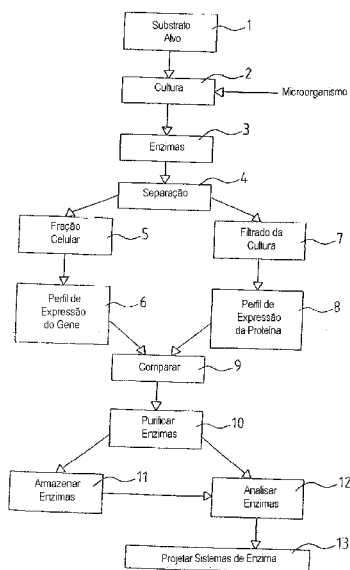
(72) Inventor(es): Alan Patrick Maloney, Anne Geraldine Stephanie Lydon, Anthony John O'Donoghue, Caroline Teresa Gilleran, Cathal Sean Mahon, Catherine Majella Collins, Francis Jeremiah Renn, Lasarina Patrívk McLoughlin, Maria Geradine Tuohy, Mary Noelle Heneghan, Patrick Gerard Murray

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT IE2007000016 de 09/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/091231 de 16/08/2007

(57) Resumo: SISTEMAS DE ENZIMA DE TALAROMYCES EMERSONII A invenção relaciona-se as cepas de Talaromyces emersonii que são termoestáveis e codificam enzimas termoestáveis. As enzimas retêm a atividade em temperaturas acima de 55°C. Estas cepas e enzimas encontram o uso em uma variedade de processos da redução resíduos à produção de ingredientes alimentícios de alimento novos e à produção de combustíveis biológicos.



SISTEMAS DE ENZIMA DE TALAROMYCES EMERSONII

INTRODUÇÃO

A presente invenção relaciona-se a uma cepa de *Talaromyces emersonii* e enzimas e sistemas enzimáticos isolados deste para utilização em gerenciamento ambiental e de dejetos, produção e processamento químico e bioquímico, processos biotecnológicos, em conjuntos de teste e de diagnósticos, probiótica e sinbiótica, produtos de cuidados de saúde, alimentos e bebidas funcionais e novéis, produção de surfactante, aplicações agrícolas e horticólicas.

Atualmente a Europa defronta uma crise no gerenciamento de dejetos com 2.000 milhões de toneladas de dejetos sendo produzidos a cada ano. Boa parte desses dejetos é orgânico, derivado de materiais de plantas (biomassa), é rico em carboidratos (açúcares) e, portanto, representa um recurso de valia quando decomposto para seus açúcares componentes. Outros tipos de dejetos como o dejetos de frutas putrefazem e representam um risco ambiental. Este dejetos é geralmente combinado com ração para suínos para extrair algum valor dele, mas, no entanto, é considerado um dejetos de baixo custo.

A biomassa representa uma matéria prima altamente variada e variável e, no entanto, é a matéria prima de energia mais renovável na Terra. Se utilizado, poderia fornecer uma alternativa sustentável aos estoques cada vez, mais se esgotando dos combustíveis fósseis. Há um interesse global em converter a reserva de energia na biomassa em formas de energia utilizável. Embora um grande enfoque tenha sido a produção de biocombustíveis, como o bioetanol, para fins de transporte, mercados para co-produtos valiosos

gerados durante a produção de biocombustíveis (por exemplo, CO₂, resíduos ricos em lignina, matéria prima química) também foram identificados. Atualmente, nos Estados Unidos, aproximadamente 13,6 bilhões de litros de etanol são produzidos do milho anualmente, essencialmente para uso no setor de combustível de transporte. Isto representa apenas aproximadamente 1% do total de consumo de combustível para veículos motorizados, e é previsto que até 2010, a produção de bioetanol terá aumentado mais de 7 vezes, e incluirá outros substratos de biomassa como resíduos da madeira. Se os resíduos da madeira forem derivados de fontes de 'dejetos' rapidamente renováveis geralmente considerados como 'cerrado' ou mato cerrado, valor considerável pode ser derivado tanto em termos dos custos do processo, satisfação de metas de produção e questões ambientais locais. As vantagens do bioetanol como uma alternativa limpa e ambientalmente amigável ao petróleo e outros combustíveis fósseis são claras. A adoção global do bioetanol como o principal combustível automotivo faria recuar muitos dos problemas de poluição do ar que são uma característica de áreas urbanas densamente populadas. Os automóveis modernos podem ser facilmente adaptados para rodar em misturas de etanol/gasolina e novos motores estão disponíveis que podem utilizar o etanol puro como a única fonte de combustível.

A biomassa de plantas, incluindo as espécies de madeiras moles, é rica em carboidratos complexos (polissacarídeos) que podem ser decompostos por meios enzimáticos ou químicos para açúcares simples fermentáveis. Por exemplo, madeiras moles como o espruce Sitka e o pinho contêm (% em peso seco) aproximadamente 41 a 43% de

celulose (um polímero de β -1,4 unidades de glicose ligadas), 20 a 30% de emicelulose (uma mistura de manose, galactose xilose e arabinose contendo polissacarídeos) e 25 a 30% de lignina, um polímero polifenólico não-carboidrato de alto valor calorífico. Se modo que cerca de 65-70% do peso seco de resíduos de madeiras é carboidrato complexo que pode ser utilizado para fornecer matéria prima rica em açúcares para fermentação até bioetanol.

Fungos representam uma das formas viventes microbiais mais importantes que decompõem esses materiais. *Talaromyces emersonii* é um fungo aeróbico termofílico encontrado naturalmente em monturos de composto e outros ecossistemas que degradam materiais ricos em biomassa. A estabilidade térmica é uma característica marcante de muitos dos sistemas de enzimas de *Talaromyces emersonii* isolados até agora. Considerados como sendo uma espécie de 'apodrecimento mole', que pode ter como alvo todas as partes do material da planta, este euasomiceto produz sistemas enzimáticos modificadores de carboidratos abrangentes, incluindo enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas, e amiololíticas, bem como uma malha de atividades de oxidase/oxidoreductase e proteolíticas. Assim o *Talaromyces emersonii* pode acessar complexos substratos de crescimento encontrados em seu habitat natural. PCT Publication números WO 01/70998 e WO 02/24926 revelam o isolamento de celulases de *Talaromyces emersonii* e, em particular, celulases tendo atividade de β -glucanase e de xilanoase. A desvantagem dessas enzimas é que elas só podem direcionar um tipo (ou um número limitado) de constituintes de um substrato. Assim, para

metabolizar um certo substrato é necessário identificar os componentes daquele substrato, produzir polipeptídeos tendo atividade adequada de enzimas para metabolizar esses componentes, produzir a quantidade necessária do polipeptídeo por procedimentos rotineiros como técnicas recombinantes, modificar os polipeptídios se necessário para alterar a termo-estabilidade ou o pH ótimo para exemplo das enzimas, expressas o polipeptídeo e utilizar a enzima resultante para direcionar aquele constituinte daquele substrato. Estes são procedimentos que consomem muito tempo e que são caros.

Ademais, esses procedimentos não levam em conta o fato de que algumas enzimas podem exibir mais de uma atividade ou, quando utilizada em combinação com outra enzima, poderia ter eficiência modificada. Assim, esses métodos poderiam levar à superprodução de enzimas que não são necessárias assim também levando a despesas excessivas e custos de tempo. Portanto, há uma necessidade de enzimas e sistemas enzimáticos isolados de *Talaromyces emersonii* e um método de isolar essas enzimas e sistemas enzimáticos que supera as desvantagens mencionadas acima.

Um objetivo da invenção é o desenvolvimento de composições enzimáticas otimizadas, particularmente composições de enzimas termicamente estáveis, para gerar 'xaropes' ricos em açúcares fermentáveis, para utilização na biomassa para iniciativas de bioetanol. Como o alvo de substratos de biomassa ou de matéria prima para a produção de bioetanol pode variar desde fluxos de dejetos (por exemplo, VFCWs e OFMSWs [Fração Vegetal de Dejetos Coletados e Fração Orgânica de Dejetos Sólidos Municipais])

a colheitas agrícolas (por exemplo, milho, beterraba, pastos, etc.) a biomassa de madeiras, obter a preparação enzimática correta, a um baixo custo de processo, para obter produções máximas de açúcares fermentáveis é um
5 desafio significativo. Há muitos anos o custo das enzimas utilizadas na conversão da biomassa antes da produção de bioetanol por fermentação microbiana tem sido um fator negativo de porte. É assim um objeto produzir preparações de enzimas a baixo custo para esses fins.

10 As preparações de enzimas da presente invenção são derivadas de fontes fungais geralmente consideradas como seguras (GRAS), enquanto as enzimas fungais em uso até agora nas aplicações comerciais e de pesquisa de bioetanol são essencialmente de fontes mesofílicas (por exemplo,
15 *Trichoderma* sp./*Gliocladium* SP., *Aspergillus* SP. e *Penicillium* SP.).

Um outro objeto da invenção é fornecer preparações de enzima que funcionam a temperaturas de reação mais elevadas, isto é, enzimas termo-estáveis permitem tempos de
20 reação mais curtos/etapas no tratamento enzimático, permitem a pasteurização simultânea do hidrolisado, resultam em hidrólise/sacarificação geral significativa, têm um potencial para reduzir o carregamento de enzima, e/ou o potencial para reciclar a preparação de enzima,
25 todos os quais poderão servir para reduzir os custos associados ao uso dessas enzimas.

DECLARAÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se a uma cepa de *Talaromyces emersonii* que foi depositada com o
30 International Mycological Institute (CABI Bioscience UK) em

22 de novembro de 2005 sob o número IMI 393751.

A vantagem de utilizar *Talaromyces emersonii* como a fonte de enzima é que ele é um microrganismo 'geralmente considerado como seguro' (GRAS) e tem um longo histórico de uso nos setores de alimentação, de bebidas, de rações animais e farmacêutico.

A vantagem desta cepa novel de *Talaromyces emersonii* é que as enzimas dela derivadas possuem atividade ótima a temperaturas entre 54°C e 85°C, com algumas enzimas mantendo atividade a temperaturas de até 95°C. Assim, essas enzimas reterão atividade mesmo quando altas temperaturas de processamento são desejáveis ou necessárias, por exemplo, produção de matéria prima rica em açúcares para a produção bioquímica, biofarmacêutica, química ou de biocombustíveis (etanol e metano), em que temperaturas de reação de 65 a 90°C facilitam velocidades de reação mais altas simultâneas, conversão de substrato mais rápida e pasteurização simultânea de matéria prima, que aprimora o armazenamento e o potencial de transporte. Adicionalmente, como temperaturas mais altas podem ser utilizadas com essas enzimas, cada processo tem um tempo de reação mais curto de modo que há tanto a economia de tempo como de custo. Uma outra vantagem é que se a temperatura for alta o suficiente, a pasteurização ocorrerá matando quaisquer microrganismos indesejáveis que não podem suportar essas temperaturas elevadas. Adicionalmente as enzimas purificadas desta cepa demonstraram ter uma vida útil mais longa.

De acordo com a invenção é ainda fornecido um sistema de enzima que compreende celobiohidrolase I ou

celobiohidrolase II ou uma mistura deles, β -glucosidase 1, um xilanoase e um endo- β -(1,3)4-glucanase. A invenção também fornece um método de utilizar este sistema de enzima para a bioconversão de planta ou de materiais derivados de plantas, como materiais de plantas virgens de origem terrestre ou marinha, e os fluxos de dejetos delas, incluindo resíduos de café, de chá, de destilaria e de bebidas, frutas e cascas/peles de frutas, cascas de vegetais, processamento de alimentos e para reuniões e festas, dejetos de folhas/horticultura, dejetos de floristas, resíduos de cereais e de processamento de cereais, outros dejetos agrícolas e de jardins, produção de padarias e dejetos de lojas, produtos de papel como revistas coloridas brilhantes e papel de impressão colorido, papel de impressão preto-e-branco, papel branco, de cor e reciclado, papel marrom, sacos de papel, cartolina e papelão, copos e pratos de papel, lenços de papel, toalhas de papel, celofane e Sellotape®, embalagem biodegradável, dejetos hospitalares ricos em celulose como bandagens, papéis, toalhas de papel, máscaras, têxteis como pijamas e toalhas e para uso subsequente na produção de biocombustível (bioetanol e biogás).

A invenção ainda relaciona-se a um sistema de enzima que compreende um celobiohidrolase I ou um celobiohidrolase II ou uma mistura deles, um β -glucosidase 1, um xilanoase e um endo- β -(1,3)4-glucanase. A invenção também fornece um método de utilização deste sistema de enzima na produção de matérias primas ricas em monossacarídeos de resíduos de plantas para a geração de produtos de alto valor, por exemplo, antibióticos, antibióticos e antivirais,

carotenóides, antioxidantes, solventes e outros químicos e bioquímicos, incluindo ingredientes de grau de alimentos, aditivos para cosméticos, oligossacarídeos e glicopeptídeos para pesquisa e glicomicos funcionais.

5 A invenção fornece uma cepa termofílica de *Talaromyces emersonii*, que tem uma faixa de temperatura de crescimento de 30 a 90°C, com uma faixa ótima de 30 a 55°C e que produz ativamente enzimas a temperaturas acima de 55°C. A cepa de *Talaromyces emersonii* foi depositada com a deposição número
10 IMI 393751. A invenção relaciona-se a um mutante do mesmo também codificando enzimas termoestáveis. Uma enzima produzida pela cepa que retém atividade a temperaturas acima de 55°C. A enzima poderá ser selecionada do grupo que consiste de enzimas modificadoras de carboidratos, enzimas
15 proteolíticas, oxidases e oxidoreductases.

A invenção também fornece uma composição de enzima que compreende um celobiohidrolase I ou um celobiohidrolase II ou uma mistura destes, um β -glucosidase 1, um xilanoase e um endo- β -(1,3)4-glucanase. A composição de enzima poderá
20 compreender 0,5 a 90% de celobiohidrolase I ou o celobiohidrolase II ou uma mistura destes, 0,1 a 33% de β -glucosidase 1, 0,6 a 89% de xilanoase e 0,4 a 68% de endo- β -(1,3)4-glucanase.

É ainda fornecido um sistema de enzima que compreende
25 CBH I (10-30%), CBH II (10-15%), β -(1,3)4-glucanase (20-45%), β -glucosidase (2-15%), e Xilanoase (18-55%). A composição poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: β -Xilosidase, α -Glucuronidase, exoxilanoase, α -L-Arabinofuranosidase, enzimas pectinolíticas, hemicelulases,
30 enzimas modificadoras de amido, oxidoreductase/oxidase e

esterases; e proteases.

A invenção também fornece um método de utilização deste sistema de enzima no processamento e na reciclagem de toras de madeiras, madeiras e produtos derivados da madeira. Este sistema de enzima é eficaz contra materiais de madeira altamente lignificados, e é resistente a moléculas inibidoras potenciais presentes em resíduos de madeiras e materiais processados (por exemplo, extrativos, resinas, produtos da decomposição da lignina, furfural e derivados do hidroxifurfural).

A invenção ainda relaciona-se a um sistema de enzima que compreende CBH I (15-30%), CBH II (10-40%), $\beta(1,3)4$ -glucanase (15-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanoase (15-30%), e 1-8% β -Xilosidase. A composição poderá ainda compreender um ou mais do que segue: Exoxilanoase; α -Glucuronidase; α -L-Arabinofuranosidase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease. A invenção também fornece um método de utilização deste sistema de enzima no processamento e reciclagem de têxteis.

É ainda fornecido um sistema de enzima que compreende CBH I (5-55%), CBH II (8-50%), $\beta(1,3)4$ -glucanase (10-30%), β -glucosidase (0,5-30%), Xilanoase (5-30%), e β -Xilosidase (0,1-10%). A composição poderá ainda compreender um ou mais do que segue: α -L-Arabinofuranosidase; α -Glucuronidase. Outras hidrolases, incluindo enzimas Pectinolíticas selecionadas, esterases; protease, e oxidases. A invenção

também fornece um método de utilização deste sistema de enzima na sacarificação de dejetos de papéis.

A invenção ainda relaciona-se a um sistema de enzima que compreende CBH I (2-10%), CBH II (2-10%), $\beta(1,3)4$ -glucanase (10-45%)m β -glucosidase (5-10%), e Xilanoase (1-30%). A composição poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: N-Acetilglucosaminidase; chitinase; $\beta(1,3)6$ -glucanase; β -Xilosidase; α -Glucuronidase; α -L-Arabinofuranosidase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease. A invenção também fornece um método de utilização deste sistema de enzima em estratégias antifúngais, de biocontrole e de controle de lodo em setores ambientais, médicos e da construção (por exemplo, controle da podridão seca), e na indústria de papel e polpa (por exemplo, controle do lodo).

É ainda fornecido um sistema de enzima que compreende CBH I (1-20%), CBH II (1-28%), $\beta(1,3)4$ -glucanase (15-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanoase (18-55%), β -Xilosidase (0,1-10%) e α -L-Arabinofuranosidase (0,5-5,0%). A composição poderá ainda compreender um o mais do seguinte: α -Glucuronidase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; protease; exoxilanoase. Outras hidrolases, incluindo enzimas Pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterases; Protease; e atividades de oxidase modificadoras de lignina. A invenção também fornece um método de utilização desse sistema de enzima em

aplicações horticolturais, por exemplo, produção de compostos bioativos novéis para a promoção do crescimento e resistência à doença. Por exemplo, este sistema pode ser utilizado para a liberação de glicosídeos flavonóide bioativo, produção de oligogalacturonídeos de materiais ricos em pectina, xiloglucopoligosacarídeos de xiloglucanos, galactopoligosacarídeos de galactanas, xilopoligosacarídeos substituídos de xilanos de plantas, ou 1,3-glucooligosacarídeos (laminarioligosacarídeos) de β -glucano da parede de célula fungal, ou laminarana algal, para a promoção do crescimento em plantas, ativação dos mecanismos de resposta de defesa da planta contra patógenos de plantas e aumentar a resistência à doença, pois alguns desses oligosacarídeos (por exemplo, laminarioligosacarídeos) pode iniciar e mediar propriedades bioativas que são antifungais, anti-bacteriais e anti-nematóides.

A invenção relaciona-se ainda mais a um sistema de enzima que compreende CBH I (5-30%), CBH II (1-15%), β (1,3)4-glucanase (10-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanoase (18-48%), 0,1-20% de β -Xilosidase, 1-10% de α -Glucuronidase e 0,1-5% de α -L-Arabinofuranosidase. A composição poderá ainda compreender um ou mais do que segue: Exoxilanoase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora do amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; exidoreductase/oxidase e esterases e protease. A invenção também fornece um método de utilização deste sistema de enzima na produção de alimentos animais para aprimorar a digestibilidade de alimentos animais com base em cereais.

Este sistema degrada os componentes fibrosos dos alimentos animais com base no cereal para oligosacarídeos e monosacarídeos (açúcares simples), alguns dos quais são absorvidos no intestino e metabolizados. O sistema também
5 produz oligosacarídeos 'probióticos' (por exemplo, glocooligosacarídeos de enlace misto de β -glucanos de cereais não-celulósicos) que estimulam o crescimento de bactérias probióticas, e podem liberar anti-oxidantes, por exemplo, ácido ferúlico, e produzem oligosacarídeos
10 (glucurono-xilooligosacarídeos substituídos de xilanos de cereais) que têm um efeito anti-bactericida em espécies da microflora intestinal conhecidas como produtoras de moléculas carcinogênicas (por exemplo, fenóis, aminas, etc.).

15 É ainda fornecido um sistema de enzima que compreende CBH I (0,5-10%), CBH II (0,5-10%), β (1,3)4-glucanase (15-43%), β -glucosidase (2-10%), Xilanoase (30-88%), 0,1-2,0% de β -Xilosidase, 0,1-3,0% de α -glucuronidase, 0,1-4,0% de α -L-arabinofuranosidase. A composição poderá ainda
20 compreender um ou mais do que segue: enzimas pectinolíticas; atividade modificadora do amido; oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease. A invenção também fornece um método de utilização deste sistema de enzima na produção de alimentos animais com base em cereais
25 que contêm baixa pentose para animais monogástricos com digestibilidade aprimorada e baixo conteúdo de β -glucano não-celulósico. β -glucanos não-celulósicos e arabinoxilanos de cereais têm alta capacidade de ligação com a água e geram soluções altamente viscosas. Animais monogástricos
30 (por exemplo, suínos e frangos) são incapazes de degradar

esses carboidratos, o que prejudica o aproveitamento e a biodisponibilidade de nutrientes importantes, aumenta a difusão de enzimas digestivas, prejudica a mistura adequada do conteúdo intestinal e age como uma barreira física para a degradação da proteína e do amido presentes nesses alimentos animais. Em geral, esses polisacarídeos podem levar a características de desempenho de crescimento fraco. O sistema de enzima nesta invenção pode catalisar a degradação dos arabinoxilanos do cereal e β -glucanos não-celulósicos para produzir oligosacarídeos (essencialmente DP3), alguns dos quais têm propriedades probióticas potenciais, sem a liberação de açúcares pentose (arabinose e xilose), que são mal metabolizadas por animais monogástricos e podem ter efeitos anti-nutricionais. Assim, a invenção fornece um método de utilizar cereais alternativos como alimentos animais, por exemplo, sorgo e milho.

A invenção ainda relaciona-se a um sistema de enzima que compreende CBH I (3-15%), CBH II (3-15%), (1,3)4-glucanase (25-45%), α -glucosidase (2-15%), Xilanoase (18-55%), 0,5-7,0 de β -Xilosidase, 0,5-10% de α -Glucuronidase, e 0,1-5,0% de α -L-Arabinofuranosidase. A composição poderá ainda compreender um ou mais do que segue: Exoxilanoase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease. A invenção também fornece um método de utilização deste sistema de enzima na produção de alimentos animais funcionais com

potencial bioativo para uso em veterinária e cuidados da saúde humana. Este sistema pode produzir oligosacarídeos bioativos de matérias primas com estado de GRAS para uso nos cuidados da saúde animal (animais de estimação e grandes animais), incluindo β -glucooligo-sacarídeos imunostimulatório de plantas e fungos terrestres e marinhos, xilooligosacarídeos com propriedades probióticas e antimicrobiais e potencial anti-viral de paredes de células de crustáceos e fungos, e compostos fenólicos com potencial antioxidante.

É ainda fornecido um sistema de enzima que compreende CBH I (1-15%), CBH II (1-15%), β (1,3)4-glucanase (10-45%), α -glucosidase (2-10%), Xilanoase (1-55%), 0,5-12% de β -Xilosidase. A composição poderá ainda compreender um ou mais do que segue: α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase; β (1,3)6-glucanase; N-Acetilglucose-aminidase; enzimas pectinolíticas de chitinase, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora do amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; protease. A invenção também fornece um método de utilização deste sistema de enzima na produção de laticínios especializados ou produtos dietéticos, por exemplo, alimentos e formulações de bebidas para o cuidado de saúde do infante e geriátrico. Por exemplo, este sistema pode ser utilizado para a produção de alimentos facilmente digeríveis ricos em probióticos para a nutrição geriátrica e infantil, e também para a produção de produtos isentos de lactose para indivíduos com galactosemia ou aqueles que são intolerantes

à lactose.

A invenção ainda se relaciona a um sistema de enzima que compreende CBH I (1-10%), CBH II (5-15%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (15-40%), α -galactosidase (2-30%), Xilanoase (15-55%), 1-12% de β -Xilosidase, 1-8% de α -Glucuronidase e 0,5-5,0% de α -L-Arabinofuranosidase. A composição poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora do amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidades; oxidoreductase/oxidase e esterases; protease. A invenção também fornece um método de utilizar este sistema de enzima nos setores de padaria e confeitaria, e na formulação de produtos de padaria de alimentos de saúde novéis. Sistemas de enzimas selecionadas são adequadas para a utilização de cereais novéis/materiais primas como centeio, milho e sorgo. O sistema de enzima pode aumentar o volume do pão e aprimorar a vida útil na prateleira ao modificar seletivamente os componentes arabinoxilano das farinhas de cereais, gerar oligosacarídeos probióticos e imuno-estimulatórios e efetuar a liberação de moléculas anti-oxidantes (por exemplo, ácidos ferúlico e coumárico), e modificar a textura, o aroma e as propriedades sensoriais de produtos da padaria e da confeitaria.

É ainda fornecido um sistema de enzima que compreende CBH I (1-20%), CBH II (1-40%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (15-45%), α -glucosidase (2-30%), Xilanoase (10-55%), 0,5-10% de β -Xilosidase, 0,5-5% de α -L-Arabinofuranosidase. A composição poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: $\beta(1,3)$ 6-

glucanase; N-Acetilglucosaminidase; chitinase α -glucuronidase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; oxidoreductase/oxidase e esterases; protease. A invenção também fornece um método de utilizar este sistema de enzima na geração de sabores, aroma e compostos de precursores sensoriais na indústria de alimentos ao liberar monisacarídeos e dissacarídeos que podem ser fermentados para uma variedade de produtos incluindo ácido cítrico, vanilina, etc. liberando glicoconjugados de sabor (precursores de aroma) de frutas/polpas de fruta (por exemplo, alcoóis aromáticos glicosilados encontrados nos sabores doce, ácidos amino para a transformação para adoçantes (por exemplo, fenilalanina) e moléculas fenólicas (ácidos cinâmicos, glicosídeos flavonóides como quercetin-3-O-ramnoside), que tem sabor, aroma ou propriedades sensoriais ou são precursores desses produtos, por exemplo, ramnose, que pode ser biotransformado para furaneol, uma molécula com sabor de morango. Além disso, algumas dessas moléculas como os glicosídeos flavonóides possuem atividade antioxidante e anti-microbial (anti-protozoária).

A invenção ainda relaciona-se a um sistema de enzima que compreende CBH I (1-15%), CBH II (1-15%), β (1,3)4-glucanase (10-45%), β -glucosidase (2-30%), Xilanoase (1-55%), 0,5-12% de β -Xilosidase. A composição poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: α -L-Arabinofuranosidase; β (1,3)6-glucanase; N-Acetilglucosaminidase; chitinase α -Glucuronidase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacto-

uronase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease. A invenção também fornece um método

5 de utilização deste sistema de enzima para a geração de alimentos funcionais, especificamente, a modificação de carboidratos de plantas (terrestre e algumas marinhas) para gerar alimentos com propriedades aprimoradas promotoras de saúde, por exemplo, alimentos enriquecidos por

10 glucooligosacarídeos imino-estimulatórios, xilooligosacarídeos, oligosacarídeos de soja, (arabino)galactooligosacarídeos, (galacto) e/ou (gluco)manooligosacarídeos, gentioligosacarídeos, isomaltooligosacarídeos e oligosacarídeos palatinose, e

15 promover a liberação de moléculas antioxidantes como caratenóides e substâncias fenólicas (ácidos cinâmicos, catechins e glicosídeos flavonóides).

É ainda fornecido um sistema de enzimas que compreende CBH 1 (1-15%), CBH II (1-15%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (10-45%),

20 β -glucosidase (1-15%), Xilanoase (1-30%), 05-20% de β -Xilosidase. A composição poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: α -L-Arabinofuranosidase; $\beta(1,3)$ 6-glucanase; N-Acetilglucosaminidase; chitinase; α -Glucuronidase; enzimas pectinolíticas, incluindo

25 galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; oxidoreductase/oxidase e esterases; protease. A invenção também fornece um método de utilização deste sistema de enzima para a produção de bebidas não-alcoólicas

30 e alcoólicas de projetista novel, sucos de frutas e bebidas

de saúde. Este sistema pode modificar β -(1,3)4=glucans, substâncias pécnicas, arabinans, xilanos, lactose, proteínas e substâncias fenólicas para gerar bebidas não-alcoólicas e alcoólicas de baixa caloria, sucos de frutas e
 5 bebidas de saúde com potencial aprimorado sensorial, anti-oxidante, elevador do sistema imune, anti-bactericida, anti-viral. Por exemplo, uma cerveja 'leve' com teor de β -glucan residual baixo para impedir a formação de atordoamento (mas com β -glucan suficiente para fornecer
 10 características de sensibilidade bucal) que contém glucooligosacarídeos de ligação mista bioativa e ácidos cinâmicos (antioxidantes), ou um suco de fruta rico em fragmentos de pectina (oligosacarídeos) que tem um efeito probiótico, e ácidos cinâmicos e glicosídeos flavonóides
 15 selecionados que fornecem potencial antioxidante.

A invenção fornece uma composição de enzima CBH I (1-25%), CBH II (1-28%), β (1,3)4-glucanase (18-40%), β -glucosidase (2-30%), Xilanoase (15-55%), e β -Xilosidase (0,7-20%). A composição poderá ainda compreender um ou mais
 20 do seguinte: α -Glucuronidase (1-10%), α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5,0%), 1-15% de exoxilanoase, 5-25% de enzimas pectinolíticas, 2-12% de atividade modificadora de amido, 2-11% de hemicelulases, 1-15% de oxidoreductases/oxidase e esterases e 2-15% de protease. A
 25 composição poderá ser utilizada na produção de alimentos animais ricos em monossacarídeos de resíduos de plantas.

A invenção fornece uma composição de enzima que compreende CBH I (12-55%), CBH II (15-30%), β (1,3)4-glucanase (12-26%), β -glucosidase (5-12%), Xilanoase (5-
 30 30%), β -Xilosidase (0,1-10%) e α -L-Arabinofuranosidase

(0,5-3,0%). A composição poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase, outras hidrolases que incluem enzimas pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterases, protease e atividades de oxidase modificadora de lignina, proteases e oxidases. A composição poderá ser utilizada no processamento e na reciclagem de madeira, produtos de papel e papel.

A invenção fornece uma composição de enzima que compreende CBH I (3-15%), CBH II (3-15%), β (1,3)4-glucanase (15-45%), β -glucosidase (1-15%), Xilanoase (16-55%), e β -Xilosidase (0,5-7%). A composição poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase, exoxilanoase, enzimas pectinolíticas, enzimas com atividade modificadora de amido, hemicelulases, oxidoreductases/oxidase e oxidases e proteases. A composição poderá ser utilizada na produção de biofármacos, como os oligosacarídeos bioativos (incluindo a ligação mista 1,3(4) e 1,3(6)-glucooligo-sacarídeos, xilooligosacarídeos ramificados e lineares, (galacto)glucomanoligosacarídeos), glicopeptídeos e glicosídeos flavonóides de plantas terrestres e marinhas, resíduos de plantas, fungos e fluxos de dejetos ou subprodutos ricos em açúcares simples.

A invenção ainda se relaciona a uma composição de enzima que compreende CBH I (1-20%), CBH II (1-40%), β (1,3)4-glucanase (15-45%), β -glucosidase (2-12%), Xilanoase (1-35%), e β -Xilosidase (1-5%). A composição de enzima poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase, exixilanoase, enzimas pectinolíticas, atividade modificadora de amido,

hemicelulases, oxidoreductases/oxidase e esterases e proteases. A composição poderá ser utilizada para aumentar a biodisponibilidade de biomoléculas com atividade anti-bactericida e anti-viral naturais, incluindo glicosídeos
5 flavonóides e cianogênicos, saponinas, oligosacarídeos e fenólicos (incluindo ácidos ferúlico e p-coumarica, epicatequina, catequina, ácido pirogálico e assemelhados).

A invenção ainda se relaciona a uma composição de enzima que compreende CBH I (3-15%), CBH II (3-15%),
10 $\beta(1,3)$ 4-glucanase (25-45%), β -glucosidase (2-15%), Xilanoase (10-30%), β -Xilosidase (0,5-8%). A composição de enzima poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase, exoxilanoase, enzimas pectinolíticas, atividade modificadora de amido,
15 hemicelulases, oxidoreductases/oxidase e esterases e protease. A composição poderá ser utilizada para aumentar a biodisponibilidade de biomoléculas antioxidantes naturais, por exemplo, carotenóides, licopenes, xantophilos, antocianinas, fenólicos e glicosídeos de todos os materiais
20 de plantas, resíduos, dejetos, incluindo várias frutas e pequenas frutas.

A invenção ainda se relaciona a uma composição de enzima que compreende CBH I (1-25%), CBH II (1-40%),
25 $\beta(1,3)$ 4-glucanase (15-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanoase (18-35%), e β -Xilosidase (0,5-12%). A composição de enzima poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase, enzimas pectinolíticas, atividade modificadora de amido, hemicelulases, oxidoreductases/oxidase e esterases e
30 protease. A composição poderá ser utilizada para a geração

de matéria prima de materiais de plantas brutas, resíduos de plantas e dejetos para utilização na produção microbiana de antibióticos por fungos e bactéria, incluindo *Penicillium sp.* e *Streptomyces sp.*.

5 A invenção ainda se relaciona a uma composição de enzima que compreende CBH I (1-30%), CBH II (1-40%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (15-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanoase (18-35%), e β -Xilosidase (0,5-8%). A composição de enzima poderá ainda compreender um ou mais do seguinte:

10 α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase, enzimas pectinolíticas, atividade modificadora de amido, hemicelulases, oxidoreductases/oxidase e esterases e protease. A composição poderá ser utilizada na geração de matérias primas de materiais de plantas brutas, resíduos de

15 plantas e dejetos para uso na produção microbiana de ácido cítrico.

A invenção ainda se relaciona a uma composição de enzima que compreende CBH I (2-15%), CBH II (2-15%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (20-45%), β -glucosidase (2-25%),

20 Xilanoase (1-30%), e β -Xilosidase (0,5-8%). A composição de enzima poderá ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase, enzimas pectinolíticas, atividade modificadora de amido, hemicelulases, oxidoreductases/oxidase e esterases,

25 exoxilanoase e proteases. A composição poderá ser utilizada na produção de oligosacarídeos de polisacarídeos algais (por exemplo, laminarana e fucoidan) e aditivos derivados de extratos de plantas, por processos considerados geralmente como seguros, na formulação de cosméticos.

30 A invenção ainda se relaciona a uma composição de

enzima que compreende CBH I (3-30%), CBH II (1-10%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (10-45%), β -glucosidase (2-12%), Xilanoase (1-48%), e β -Xilosidase (0,1-8%). A composição de

5 Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase, enzimas pectinolíticas, atividade modificadora de amido, hemicelulases, oxidoreductases/oxidase e esterases, exoxilanoase e proteases. A composição poderá ser utilizada na produção de oligosacarídeos e glicopeptídeos para uso
10 como reagentes em pesquisa, na produtor de biosensores e como ferramentas na glicômica funcional para sondar interações receptor-ligante e na produção de bibliotecas de substrato para criar o perfil de especificidade enzima-substrato.

15 A invenção ainda se relaciona a uma composição de enzima que compreende CBH I (5-15%), CBH II (5-30%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (20-45%), β -glucosidase (1-12%), Xilanoase (10-30%), e β -Xilosidase (0,5-8%). A composição de enzima poderá ainda compreender um ou mais do seguinte:
20 α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase, enzimas pectinolíticas, enzimas com atividade modificadora de amido, hemicelulases, oxidoreductases/oxidase e esterases, e proteases. A composição poderá ser utilizada para a produção de celulose modificada e β -glucanos,
25 celooligasacarídeos, amidos modificados e maltooligasacarídeos, lactulose e polióis (por exemplo, manitol, glucitol ou dulcitol, xilitol, arabitól).

A invenção também fornece a utilização de um substrato produzido por qualquer um dos métodos acima como uma
30 matéria prima na produção de biocombustível, e bioetanol ou

biogás como metano ou dióxido de carbono sempre que produzido por aquele processo. A vantagem de utilizar este sistema de enzima para produzir bioetanol ou biogás, é que este é um método eficaz de custo de produzir um produto de
5 valia que pode ser utilizado em muitas indústrias, de um produto de dejetos de pouco valor. Ao mesmo tempo em que produz um produto valioso, há uma redução no dejetos que, por sua vez, tem um impacto ambiental positivo.

Todos os métodos descritos acima poderiam ser
10 realizados com as composições de enzima conforme aqui definidas, ou com as cepas microbiais aqui descritas.

A invenção também fornece composições de enzima e métodos de utilizá-las que ainda compreendem enzimas derivadas de outras espécies fungais que incluem *Chaetomium*
15 *thermophile* e *Thermoascus aurantiacus*.

Preferivelmente a cepa de microrganismo é selecionada do grupo que consiste de um ou mais de *Talaromyces emersonii*, *Chaetomium thermophile* e *Thermoascus aurantiacus*.

20 Ainda preferivelmente a cepa de microrganismo é *Talaromyces emersonii* IMI 393751 ou um mutante da mesma que também seja capaz de produzir enzimas capazes de atividade em temperaturas de ou acima de 55°C.

De acordo com a invenção é ainda fornecido um método
25 para obter um sistema de enzima adequado para converter um substrato alvo, o método compreendendo: obter uma amostra do substrato alvo; permitir que um inóculo de uma cepa do microrganismo cresça no substrato alvo e secrete enzimas; recuperar as enzimas secretadas durante o crescimento no
30 substrato alvo; determinar as atividades enzimáticas e as

propriedades das enzimas; construir um perfil de expressão de gene; identificar proteínas da enzima e construir um perfil de expressão de proteína; comparar a expressão de gene com o perfil de expressão de proteína; purificar as
5 enzimas. As enzimas poderão então ser armazenadas. O método poderá ainda compreender analisar as enzimas; e/ou projetar um sistema de enzima.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção será mais claramente compreendida da
10 descrição seguinte de uma versão da mesma, dada apenas por meio de exemplo com referência aos desenhos acompanhantes, em que:

A Figura 1 é um delineio de processo para um método para projetar um sistema de enzima adequado para converter
15 um substrato alvo.

A Figura 2 ilustra a geração de uma matéria rica em açúcares para a produção de biocombustível pelo tratamento por termozima de polpa/bagaço da maçã.

A Figura 3 ilustra o cromatograma de camada fina dos
20 produtos gerados durante a hidrólise de copo de papel.

A Figura 4 ilustra a microscopia eletrônica de copos de papel antes (0h) e depois (24h) do tratamento com *Talaromyces emersonii* do coquetel induzido por copo de papel demonstrando extensa hidrólise do substrato alvo.

25 As Figuras 5A-5D apresentam a comparação da produção de xilanoase pela cepa 393751 e a cepa do tipo selvagem CBS 549.92 (anteriormente CBS 814.70).

As Figuras 6A-6E apresentam uma comparação da produção de glucanase e de (galacto)mananase pela cepa 393751 e a
30 cepa do tipo selvagem CBS 549,92.

A Figura 7 ilustra a redução de volume do dejetto clínico rico em celulose esterilizado catalisado pelos coquetéis de 10 enzimas a 50°C após 24 horas.

5 A Figura 8 ilustra a redução do dejetto clínico rico em celulose esterilizado por STG e catalisado pelo coquetel de 10 enzimas a 70°C após 24 horas.

As Figuras 9A e 9B mostram o dejetto rico em celulose não tratado (A), e o dejetto tratado enzimaticamente (B).

10 As Figuras 10A e 10B ilustram a produção por *S. cerevisiae* em hidrolisados obtidos pelo tratamento de dejetto clínico rico em celulose esterilizado a 70°C por 24 horas (unidade a 60%) com o Coquetel 5 (A) e o Coquetel 8 (B).

15 A Figura 11A ilustra o efeito do pH na atividade da celulase em coquetéis de *T. emersonii*.

A Figura 11B ilustra o efeito do pH sobre a atividade de xilanoase nos coquetéis de *T. emersonii*.

A Figura 12 apresenta o efeito da temperatura na atividade de celulase nos coquetéis de *T. emersonii*.

20 A Figura 13 mostra o efeito da temperatura na atividade de xilanoase nos coquetéis de *T. emersonii*.

A Figura 14 ilustra a nova xilanoase purificada contra diferentes xilanos, OSX, Xilano de Aveia de Spelts, WSX, xilano de palha de trigo, LWX, xilano de madeira de lariço, 25 BWX, xilano de vidoeiro, RM, Rhodymenan (algal vermelha 1,3; 4- β -D-xilano). A atividade é expressa como uma porcentagem relativa ao xilano de aveia de Spelts (100%).

As Figuras 15A e 15B apresentam a atividade de Xyn IV purificado (A) e Xyn XI (B) contra diferentes xilanos. A 30 atividade é expressa como uma porcentagem em relação ao

xilano de aveia de Spelts (100%).

As Figuras 15C e 15D ilustram a atividade de Xyn VII purificado (C), e de Xyn VIII (D) contra diferentes xilanos. A atividade é expressa como uma porcentagem em
5 relação ao xilano de aveia de Spelts (100%).

As Figuras 15E e 15F mostram a atividade do Xyn IX purificado (E) e do Xyn X (F) contra diferentes xilanos. A atividade é expressa como uma porcentagem em relação ao xilano de aveia de Spelts (100%).

10 A Figura 15G mostra a atividade do Xyn XI purificado contra diferentes xilanos. A atividade é expressa como uma porcentagem em relação ao xilano de aveia de Spelts (100%).

A Figura 16 apresenta a atividade relativa em porcentagem do Xyn XII purificado contra uma variedade de
15 polisacarídeos purificados. OSX, xilano de aveia de Spelts; BBG, β -glucano de cevada; LIC, Liquefano; CMC, Carboxiletilcellose; LAM, Laminarina; D1, Dextrano; D2, Dextrina; INU, Inulina; ARA, Arabinana; GAL L, Galactana (Lupin); GAL P, Galactana (Batata); RG, Ramnogalacturonana;
20 LWAG, arabino-galactana de videiro.

A Figura 17 ilustra a atividade específica do Xyn XII purificada contra aril β -xilósídeos e aril β -glucosídeos.

A Figura 18 mostra uma comparação das atividades específicas de xilanoases selecionadas expressas por IMI
25 393751 e CBS 549,92 contra OSX como substrato de ensaio.

Com referência à Figura 1, é fornecido um esboço de processo para projetar um sistema de enzima para converter um substrato alvo. Na etapa 1, o substrato alvo é obtido. Na etapa 2, o substrato alvo é inoculado com o
30 microrganismo que é cultivado no substrato alvo para

fornecer uma cultura. O microrganismo secreta enzimas e estas enzimas são recuperadas na etapa 3, ao obter amostras da cultura. As amostras da cultura são separadas em fração celular e filtrado da cultura na etapa 4. A fração celular (nRNA) é analisada na etapa 5, para determinar as atividades e propriedades enzimáticas. Na etapa 6, um perfil de expressão de gene é construído com base na análise da etapa 5. Na etapa 7, o filtrado da cultura é selecionado quanto à atividade de proteína e um perfil de expressão de proteína é construído na etapa 8. Na etapa 9, os perfis de expressão de gene e de proteína são comparados. Na etapa 10, as enzimas são purificadas. As enzimas poderão ser armazenadas na etapa 11 e na etapa 12 as enzimas poderão ainda ser analisadas e um sistema de enzima é projetado na etapa 13.

Verificou-se que quando o fungo é utilizado como o microrganismo, resultados melhores são obtidos quando o substrato for inoculado com o micélio do fungo. Este cultivo é preferivelmente realizado em um fermentador e as condições de reação irão variar dependendo do tipo de microrganismo e substrato utilizados. O cultivo poderá ser quer na forma de fermentação líquida ou de estado sólido. Para *Talaromyces emersonii*, a temperatura de cultivo na região de 45°C a 65°C é preferível, as enzimas estando ativas otimamente até 85-90°C

As enzimas são recuperadas do substrato alvo pela separação da biomassa celular (fungal) do filtrado de cultura extracelular utilizando centrifugação no caso de enzimas produzidas por fermentação líquida, ou com o auxílio de um sistema de separação de célula para culturas

maiores. As enzimas são então recuperadas da fração de biomassa celular pela homogeneização de um peso conhecido da biomassa em dois volumes de tampão. Tampões adequados incluem 50 mM de acetato de amônia, pH 4,5-6,0 ou 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0-8,0. Para a extração das enzimas para culturas no estado sólido, as culturas foram misturadas com 10 volumes de 100 mM de tampão de citrato de fosfato, pH 5,0, contendo 0,01% (v/v) Tween 80, homogeneizado e extraído por agitação durante duas horas a 14,7 rad/s à temperatura ambiente. Um extrato rico em enzimas é então recuperado por centrifugação.

É essencial que seja realizada uma comparação do sistema de enzima tanto ao nível de genoma como de proteoma, isto é, os genes, produtos de expressão (mRNA) e as proteínas identificadas são comparadas. Isto é devido ao fato de que poderá haver informação genética presente que é expressa ao nível de mRNA, mas não traduzida para proteína funcional ao nível de proteína. As análises transcriptômica, genômica e proteômica são importantes para determinar a abundância relativa de certas enzimas.

Um isolado da cepa de fungo filamentoso, da qual algumas das enzimas da invenção foram isoladas foi depositada com o International Mycological Institute (IMI) (CABI Bioscience UK), Bakeham Lane, Englefield Green, Egham, Surrey TW209TY, Reino Unido, para os fins do procedimento de patente em 22 de novembro de 2005 - Número de depósito IMI 393751. Após a purificação das enzimas elas podem ser opcionalmente armazenadas ou analisadas diretamente para obter (a) informação detalhada sobre a termo-estabilidade individual/atividade térmica em

propriedades catalítica e funcional gerais, (b) informação detalhada sobre seu modo de ação e potencial catalítico, individualmente e em combinação, (c) informação sobre interações sinérgicas, (d) informação de sequência parcial
5 que auxiliaria na clonagem dos genes, e (e) em alguns casos, obter proteína suficiente para facilitar a coleta de dados estruturais em 3-D. A análise dessas enzimas é então explorada para identificar sistemas de enzima chaves e tempos de colheita ótimos para esses sistemas. Os sistemas
10 podem ser otimizados com relação aos níveis de atividades chaves e misturas de enzimas chaves, características de desempenho e condição (na escala de laboratório) para as aplicações alvo.

Exemplo 1: *T. emersonii* IMI393751, isolamento:

15 Cortes de grama (gramados) limpa recém colhida (~200g) e outra biomassa de planta mista foram colocados em um depósito fechado para simular um ambiente de compostagem, e incubada em câmara de temperatura constante, a 65°C, por aproximadamente duas horas (pasteurização combinada e
20 equilíbrio do substrato). O teor de umidade foi mantido a ~65-70°C. O depósito foi dotado de uma linha que fornece um pulso baixo de ar filtrado úmido a intervalos. Após duas horas, uma suspensão de esporo (1×10^8 esporos em 2% de água estéril) de *T. emersonii* (cepas de laboratório de um
25 isolado de 12 anos de idade, originalmente de CBS814,70) foi utilizado para inocular a região central da biomassa. A temperatura foi mantida a 65°C por dois dias, e aumentada em intervalos de 2°C a cada 24 horas daí em diante até uma temperatura de ar de 70°C ser atingida internamente na
30 câmara. A cultura foi crescida por mais sete dias antes de

uma amostra da região central ou 'ponto quente' inoculado ser removido assepticamente e transferido para placas de ágar. (meio de ágar de Emerson para os fungos termofílicos), e sub-culturado, para assegurar a pureza da cultura; a pureza foi conferida por verificação cruzada por análise microscópica. Meio líquido contendo nutrientes básicos (Tuohy et al., 1992; Moloney et al., 1983) e 2% (m/v) de glicose foi inoculado com peças de 1 cm² de material de micélios das culturas da placa de ágar de 36 horas de idade. Culturas líquidas foram crescidas a 55°C em frascos Erlenmeyer de 250 mL (contendo 100 mL de meio de crescimento), com agitação a 23 rad/s. Alíquotas (2,0 mL) de suspensões de micélios foram removidas após 36 horas, lavadas assepticamente com água estéril, transferidas para placas de Petri estéreis (100 mm de diâmetro) e irradiadas com luz UV a intervalos cronometrados (10-60 s). Meio de ágar estéril (ágar nobre contendo 0,2% m/v de repressores de catabólitos individuais, como 2-deoxiglicose) foram inoculados com amostras do micélio fungal irradiado. Culturas replicadas foram incubadas a 45 e a 58°C. Colônias únicas foram cuidadosamente selecionadas (aparência branca fofa), transferida assepticamente para placas de ágar de dextrose de Sabouraud e purificada ainda através de várias transferências. A cepa IMI 393751 representa um isolado tomado das placas incubada a 58°C. O mutante foi avaliado em estudo comparativo com o organismo paterno, por estabilidade térmica aprimorada e produção de enzima, que revelou diferenças claras entre ambas as cepas em termos de aparência da cultura, capacidade de esporular (a cepa IMI 393751 e não-espurolante), termofilicidade e estabilidade,

padrões de produção de enzima sob condições de crescimento idênticas, expressão diferencial e níveis de atividades enzimáticas individuais.

Diferenças Fisiológicas/Micológicas entre CBS 814,70 e
5 **IMI 393751**

Aparência da cultura durante o crescimento em mídia de ágar
diferentes

Quando cultivada em ágar de Emerson CBS814,70 tem as características típicas desta espécie (Stolk & Samson,
10 1972), isto é, pálido, cremosa/amarelo claro, com tons amarelados pálidos próximo da superfície de ágar (ao redor da zona de inoculação), que passa para uma cor mais profunda amarelado escuro/marrom avermelhado com a maturação da cultura, e consiste de um material de micélios
15 denso de muitos ascomata. Em contraste, IMI393751 é bem mais branca e a cultura tem uma aparência muito "fofa".

Diferenças com relação à esporulação: CBS814,70 é uma cepa esporulante de *T. emersonii* que produz conidióforos, asci e ascósporos. Os conidióforos parecem como ramos
20 perpendiculares em hifas (de cor amarelo pálido e septado). O asci, ou esporo que contém sacos são de formato um tanto elipsóide, e muitas vezes pode ser encontrado em cadeias; os ascósporos são lisos e de formato elíptico (aparência verde em micrografo de elétrons). Em contraste, os micélios
25 do IMI393751 produzem muito poucos conidióforos clássicos, asci e ascósporos. Em contraste completo ao CBS814.70, IMI393751 só produz um número parco de esporos sob condições extremas e bastante específicas, enquanto a cepa CBS814,70 produz esporos em vários meios diferentes.

30 **Diferenças com relação à termofilicidade e faixa de**

temperatura para crescimento ótimo: CBS814,70 tem uma faixa de crescimento estreita de 35-55°C, com fraco crescimento a temperaturas mais baixas ou mais altas e uma faixa de crescimento ótimo de 40-45°C. Por outro lado, IMI393751
5 exibe uma faixa de temperatura de crescimento mais ampla de 30-65°C, com bom crescimento a 80°C, 85°C e até 90°C, com o ótimo entre 48-55°C. IMI393751 cresce muito bem >55°C e continua a produzir altos níveis de biomassa fúngica (micélios) e secretar ativamente quantidades significativas
10 de várias proteínas.

Diferenças com relação ao crescimento a valores de pH mais altos: CBS 814,70 não cresce bem (em verdade, começa a morrer) a valores de pH superiores ao pH 6-6,5 (dados anteriores, Tuohy & Coughlan, 1992), enquanto IMI393751
15 cresce bem e secreta níveis substanciais de enzimas a valores de pH até pH 9,0.

Crescimento sob condições de nutrientes limitadas/depauperadas: IMI393751 sobrevive bem em culturas com nutrientes depauperados por até 55 dias, enquanto CBS
20 814,70 sobre autólise de 7 dias em diante e poucos micélios/células sobreviventes permanecem após 15 dias. Os micélios colhidos de culturas líquidas depauperadas de nutrientes de 55 dias de idade de IMI393751 puderam ser ressuscitados pela transferência para meio de ágar de
25 dextrose de Sabraud, enquanto os restos de micélios da cepa CBS814,70 (55 dias de idade) não puderam ser reavivados pela mesma abordagem.

Exemplo 2: um sistema de enzima de *Talaromyces emersonii* para converter materiais hemicelulósicos: A
30 hidrólise completa de xilano requer a ação sinérgica de

xilanoases, β -xilosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e esterases. A Tabela 1 dá um exemplo de substratos alvos selecionados (incluindo dejetos/resíduos) e a porcentagem de fonte de carbono indutor utilizada neste exemplo. A porcentagem de indução refere-se ao peso da fonte de carbono por volume de meio (g/100mls).

Tabela 1: Substratos de crescimento/fontes de carbono indutor para a produção de enzima por *T. emersonii*

Fonte de carbono	Abreviação	% da fonte de carbono indutora
xilano de faia	BEX	1,0
xilano de vidoeiro	BWX	1,0
xilano de aveia de Spelt	OSX	1,0
xilano de lariço	LWX	1,3
arabinoxilano de trigo	WAX	1,0
aparas de spruce	SS	2,0-6,0
Material de embalagem	PK	0,5-6,0
Palhas de cereais	CS	1,0-2,0
Copos de papel	PC	2,0-6,0
Papel de escritório branco	WOP	2,0-6,0
Folhas de chá	TL	2,0-4,0
Metil xilose	MEX	0,2
xilose	Xyl	1
ácido glicurônico	GlcA	1
Solka floc	SF	2 [^]
Glicose	Glc	2 [^]
[^] Incluído para fins de comparação.		

Com base nos resultados obtidos, um sistema de enzimas foi projetado utilizando enzimas purificadas de *Talaromyces emersonii* para a degradação de um pelicelulose (xilano) ou produto derivado de madeira rico em xilano, resíduo ou dejetos. As quantidades relativas das enzimas chaves presentes no sistema de enzima são tabuladas na Tabela 2.

Tabela 2: Sistema para a degradação de uma hemicelulose ou produto de madeira rico em xilano

ENZIMA	% NECESSÁRIA
Xilanoase	10-50%
Exoxilanoase	4,0-25,0%
β -Xilosidase	0,1-5,0%
α -Glucuronidase	0,2-4,0%
α -L-Arabinofuranosidase	0,1-5,0%
Atividades modificadoras biopoliméricas acessórias (por exemplo, celulase, β -glucanase não celulolítico, atividades pectinolíticas, atividades mananolíticas, acetil(xilano) esterase, ixodireductase, protease)	25-50%

As quantidades relativas das atividades chave, o perfil e as quantidades relativas das atividades acessórias irão variar dependendo da composição do substrato alvo. A Tabela 3 esboça sistemas de enzima de *Talaromyces emersonii* que foram projetados para aplicações específicas.

Tabela 3: Sistemas de enzimas específicos adequados para a degradação de oligosacarídeos de xilanos de madeira, jornais e resíduos madeirosos

Sistema e composição da	Aplicações/subs trato do alvo	Dosagem da enzima**	% de hidrólise
-------------------------	-------------------------------	---------------------	----------------

enzima	selecionado		do carboidra to
Célula de madeira TE (induzida por LWX) *	Oligosacarídeos de xilanos de madeira	15-30 nkat/g de xilano	91-100% (1-3 h)
Xilanoase a 15- 30% [^]			
β -Xilanoase [^] a 0,2-1,0%	Bioconversão de jornais	11,5-46,0 nkat/g de jornais ^s	70-85% de carboidra to presente [‡]
α -L- Arabinofuranosid ase a 0,1-3,0%		46,0-150 nkat/g de resíduos madeirosos	
Celulase a 7-10%	Bioconversão de resíduos madeirosos (por exemplo, serragem, cepilh os, madeira virgem, casca de árvore, etc.)		34-50% (70°C/24 horas) ^{^^} 35-55% (80°C/24 horas) ^{^^}
[^] Níveis de xilanoase foram medidos com xilanos de modelos diferentes como substratos			
* LWX, glucuronoarabinóxilano de lariço			

** Níveis de xilanoase: 45,2 IU/mL (753,5 nkat/mL), 40,9 IU/mL (681,8 nkat/mL) e 27,5 IU/mL (458,4 nkat/mL) com xilano de lariço, xilano de bétula e xilano de aveia de Spelts como substratos de ensaio, respectivamente; ao tempo da colheita, em que nkat=nanokatal (16,67 IU/mL)
\$ Dependendo do grau do papel, isto é, colorido verso preto-e-branco, polido verso acabamento grosseiro/reciclado, etc.
% Celulose, 40-55% e Hemicelulose, 25-40% como os tipos principais de carboidratos presentes
^^% Conversão de substrato de madeira mole (não processada e frações processadas grosseiramente, não tratada e pré-tratada com ácido diluto). Conversão % total pode ser aumentada (até 74%) utilizando este sistema de enzima em uma mistura com outros sistemas de <i>T. Emersonii</i> ou <i>Chaetomium thermophile</i> , ou amplificação de atividades de enzima chaves pelo acréscimo de enzima recombinante

Exemplo 3: Sistema de *Talaromyces emersonii* para converter cereais, polpa de beterraba, e outros materiais (incluindo dejetos) ricos em arabinoxilanos e hemiceluloses acetiladas.

5 A Tabela 4 fornece quantidades relativas de diferentes atividades enzimáticas em sistemas de enzima projetados de *Talaromyces emersonii* IMI393751 e duas cepas mutantes identificadas anteriormente projetadas para a conversão de cereais, polpa de beterraba, e outros materiais (incluindo dejetos) ricos em arabinoxilanos e hemiceluloses acetiladas.

Tabela 4: Atividades de enzima para conversão de materiais ricos em arabinoxilanos e hemiceluloses acetiladas

Preparo e composição da enzima	<i>T. emersonii</i> (IMI39375 1; 1:1 WB/BO como indutor)	<i>T. emersonii</i> (IMI39375 1; alfarroba em pó como indutor)	<i>T. emersoni</i> <i>i</i> (mutante TC2; WB como indutor)	<i>T. emersoni</i> <i>i</i> (mutante TC5; folhas de chá como indutor)
	Perfil de atividade da enzima (%)	Perfil de atividade da enzima (%)	Perfil de atividade da enzima (%)	Perfil de atividade da enzima (%)
Xilanoase	20-30%	15-25%	35-50%	12-20%
Exoxilanoase	5-10%	2-5%	10-15%	2-8%
β -Xilosidase	0,5-2,0%	0,2-1,5%	0,5-1,5%	0,1-1,0%
α -Glucuronidase	0,5-2,0%	0,2-1,5%	0,2-1,5%	0,2-1,5%
α -L-Arabinofuranosidase	0,5-2,0%	0,2-2,0%	0,2-1,2%	0,1-1,5%
Enzimas modificadoras de biopolímeros incluindo acetil esterase e acetil xilano esterase	30-45%	32-50%	20-35%	25-60%

Exemplo 4: Sistemas de *Talaromyces emersonii* para converter materiais não-celulósicos, como folhas de chá e

alfarroba em pó.

A caracterização de três endoglucanases (EG) novas, que são importantes tanto para a modificação seletiva quanto a degradação de uma variedade de resíduos de cereais, incluindo candidatos potenciais para cervejarias e alimentos para animais, como sorgo, milho e centeio. Essas três enzimas foram purificadas de *Talaromyces emersonii* IMI393751.

O teor de carboidratos totais das preparações de enzima purificada foi determinada pelo método de ácido sulfúrico-fenol (Dubois et al.) por referência a curvas padrão de glicose ou manose ($20-100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Técnicas de separação de proteína.

A filtração de gel sequencial, a troca de íons, a interação hidrofóbica e as cromatografias de afinidade de lectina e cromatofocalização (pseudo troca de íons) foram necessárias para obter preparações altamente purificadas de EG V, EG VI e EG VII. Eletroforese de gel não-denaturado e focalização isoelétrica seguida por tingimento de azul de coomassie foi efetuada pela metodologia padrão conhecida por pessoa versada no campo e fornece as referências relevantes (por exemplo, Murray et al., 2001; Tuohy & Coughlan, 1992, Tuohy et al 2002; Maloney et al, 2004). Experimentos iniciais revelaram que os valores pI do EG V-VII foram <pH 3,5. Portanto, a cromatofocalização em PBE 94, pré-equilibrada com 0,025 M piperazina-HCl, pH 3,5, foi utilizada para determinar valores de pI precisos para EG V-VII. O pH correspondente ao pico de eluição para β -glucanase foi determinado como sendo o pI. Diferenças de 0,01 unidades de pH poderiam ser detectadas assim produzindo

valores de pI precisos para cada enzima.

pH e temperatura e estabilidades ótimas.

Valores de pH ótimos foram determinados pela monitoração da atividade de enzima a valores de pH entre 2,5 e 9,0, a 50°C, em tampão de citrato-fosfato de potência iônica constante. Para avaliar os efeitos do pH na atividade de EG V-VII, amostras purificadas de cada enzima foram incubadas ao pH de 4,0, 5,0 e 6,0 a 50°C. Alíquotas foram removidas após 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 e até 336 horas (14 dias), diluído de maneira apropriada em tampão de 100 mM NaOAc, pH 5,0 (ensaio de pH normal) e ensaiado para atividade residual de acordo com o método de ensaio padrão. A estabilidade de cada enzima purificada foi investigada a 50°C, 60°C, 70°C e 80°C, na ausência do substrato. EG V-VII não eram proteínas modulares pois nenhuma das três enzimas adsorvida para celulose (ou outro carboidrato insolúvel, isto é, eles não continham ligação de carboidrato.

A especificidade de substrato em vários polisacarídeos e glicosídeos sintéticos foi avaliada ao medir a atividade contra uma ampla variedade de carboidratos (BBG, lichenan, CMC, outros polisacarídeos e glicosídeos sintéticos) utilizando o procedimento normal de ensaio de β -glucanase.

Efeitos de íons de metais, reagentes de modificação química e inibidores potenciais

Uma gama de íons monovalentes, divalentes e de metais pesados, em concentrações de ensaio final de 1,0 mM, foram investigadas por seus efeitos potenciais nas atividades de EG V, EG VI, e EG VII, ao incubar os enzimas com os produtos químicos e depois conduzir o ensaio de enzima

normal. Finalmente, foram examinados os efeitos inibidores de glicosídeos, como os dissacarídeos, lactonas e glicosídeos flavonóides nas enzimas purificadas. Concentrações especificadas de cada glicosídeos foram
5 incluídas nos coquetéis de ensaio normais e a atividade residual determinada por comparação com controles (nenhum glicosídeo presente).

Um resumo da purificação de EG V, EG VI e EG VII, e os parâmetros de purificação como produção (%) são dados na
10 Tabela 5.

Tabela 5: Resumo da purificação de enzimas de endoglucanase de *Talaromyces emersonii*

Etapa de purificação	Atividade Total (IU)	Proteína total (mg)	Atividade específica (IU.mg ⁻¹)	Fator de purificação (x-vezes)	Produção (%)
Extrato cru	54,806.2	537,1	95,6	1,00	100,00
Ultra-filtração (amicon DC2)	50,613.4	452,2	111,9	1,17	92,30
Propan-2-ol	50,016.9	364,8	137,4	1,44	92,30
Troca de ânions (DE-52, pH 5.5)	25,064.7	240,1	104,4	1,10	45,70
Fenil Sefarose CL-4B					
Pico 1	3,862.6	24,9	154,9	1,62'	7,10
Pico 2	6,763.5	30,8	219,3	2,29	12,30
Pico 3	14,411.1	42,1	342,3	3,58	26,30
EG VII (pico 1)					
Concanavalina A	3,120.2	11,3	275,9	2,89	5,70

Sephacryl S-100 HR	670.1	3,2	212,5	2,22	1,20
Cromatofocusina	400.4	0,53	756,9	7,92	0,71
EGV, EGV I (pico 3)					
Troca aniônica (DE-52, pH 4.5)	4,662.3	10,40	447,4	4,68	8,50
Troca aniônica (DE-52, pH 7.0)	3.339,2	5,77	579,1	6,06	6,10
Biogel P-60	3.043,8	3,60	855,7	8,95	5,50
Concavalina A					
Pico 1	1,115.6	1,60	679,1	7,10	2,10
Pico 2	863.50	1,20	738,7	7,73	1,60
Cromatofocusina PBE 94, pH 3.5-2.0					
EG V		0,54	764,8	7,99	0,76
EG VI		0,18	947,6	9,09	0,31

Produções, bem como os valores de atividade específica final, foram similares para EG V e EG VII, enquanto EG VI foi obtido a uma produção mais baixa e tinha uma atividade específica mais alta.

5 Homogeneidade de enzima M_r e valores pI.

O tingimento positivo com o reagente Schiff (resultados não mostrados) indicaram que todas as três enzimas eram glicoproteínas de subunidade única. A homogeneidade de cada preparação de enzima foi verificada pelo IEF. Os valores pI
10 obtidos foram os seguintes: EG V, 2,45; EG VI, 3,00; EG VII, 2,85.

Evidência para a glicosilação e estimativa de coeficientes de extinção molar.

Teor de carboidratos totais (m/m) foram de $22,6 \pm 0,1\%$,
15 $14,7 \pm 0,1\%$, e $65,9 \pm 0,04\%$ para EG V, EG VI e EG VII, respectivamente. Os valores de coeficiente de extinção molar (ϵ_{280}) (mol.L.cm^{-1}) foram de $1,04 \times 10^{-5}$ para EG V, de $8,80 \times 10^{-6}$ para EG VI e de $7,05 \times 10^{-6}$ para EG VII.

pH e temperatura ótima e estabilidades

20 As três enzimas estiveram ativas por faixas de pH relativamente amplas mas exibiram valores ótimos de pH ácido de 5,7, 5,4, e de 5,7 para EG V, EG VI e EG VII, respectivamente. Um pH ótimo de 4,5 foi obtido para a atividade BBGase no extrato cru de *T. emersonii*.
25 Aproximadamente 75% da atividade ótima foi evidente entre pH 3,0 e 7,0 (EG V), pH 2,5 e 7,5 (EG VI) e pH 2,8 e 7,5 (EG VII).

A liberação de açúcares redutores de BBG, ao pH de 5,0 por mais de 10 min, a 30-90°C. Valores de temperatura ótima
30 para a atividade foram 78,0°C, 78,0°C e 76,0°C para EG V,

EG VI, e EG VII, respectivamente. Energias de ativação (E_a), estimadas de plotagens de Arrhenius, foram de $21,2 \pm 0,05$ kJ.mol⁻¹ para EG V, $23,5 \pm 0,02$ kJ.mol⁻¹ para EG VI, e $26,7 \pm 0,05$ kJ.mol⁻¹ para EG V, $23,5 \pm 0,02$ kJ.mol⁻¹ para EG VI, e $26,7 \pm 0,05$ kJ.mol⁻¹ para EG VII.

O efeito do pH na estabilidade da enzima foi investigada a pH 5,0, pH 5,5 e pH 6,0 (a 50° e a 70°C). A estabilidade do pH foi maior na faixa de pH 4,0-7,0, por um período de incubação de uma hora, com um decréscimo acentuado observado no pH <4,0 e >7,0 EG V perdeu nenhuma atividade a pH 5,0 e 50°C por um período de 15 dias, enquanto EG VI e EG VII perderam atividade mínima (13,0% e 11,5%, respectivamente). No entanto, a 70°C e o mesmo pH, EG V, EG VI e EG VII perderam 42%, 35% e 33%, respectivamente, da atividade original em cada amostra por um período de 60 minutos. Ao pH de 5,5 (50°C), EG VI, EG VI e EG VII perderam 30%, 22% e 8% de suas respectivas atividades originais por um período de 15 dias, mas a 70°C, EG V foi desestabilizado ainda mais (diminuição de 58% na atividade original após 60 minutos), enquanto a atividade de EG VI e de EG VII após 60 minutos foi muito similar àquela obtida após a incubação ao pH de 5,5 e 70°C. EG V foi consideravelmente menos estável ao pH 6,0 e 50°C, perdendo 63% de sua atividade original em 15 dias. EG VI e EG VII foram consideravelmente mais estáveis neste último pH, com estabilidades similares àsquelas determinadas ao pH 5,5 (perda de 30% da atividade para ambas as enzimas). Ao aumentar a temperatura de incubação para 70°C, a atividade do EG V diminuiu acentuadamente (65%) por um período de incubação de 60 minutos (ao pH de 6,0), enquanto EG VII

permaneceu admiravelmente estável, perdendo apenas 22% de sua atividade original. Valores de meia vida ($T_{1/2}$) foram em excesso de 15 dias ao pH de 5,0 e 50°C, enquanto a 70°C os valores variaram de 67 minutos (EG V) para >80 minutos (EG VI e EG VII).

Evidência para estrutura modular

EG V, EG VI, e EG VII adsorveram fracamente para Avicel (celulose microcristalina) ao pH de 5,0 e 4°C (adsorção de 8-15%); no entanto, esta extensão de adsorção não é indicativa da presença de um módulo de ligação de carboidrato (CBM).

Efeito dos íons de metais, modificadores químicos e inibidores potenciais na atividade da enzima

Os efeitos de 1 mM de concentrações finais de uma faixa de cátions mono, di e multivalentes na atividade de EG V, EG VI e EG VII, foram investigados. A atividade foi expressa como um percentual relativo a um controle (nenhum íon de metal presente na mistura de incubação). Em geral, íons de metal pesado são tidos como inativadores de enzimas ao formar sais covalentes com cisteína, histidina ou grupos carboxil. Embora um número dos íons de metal, Mg^{2+} , Zn^{2+} e Mo^{6+} aprimoraram a atividade de todas as três enzimas e íons como Ag^+ , Fe^{2+} e especialmente Mg^{2+} diminuíram acentuadamente a atividade de EG V-VII. Notáveis diferenças inter-enzimáticas foram observadas para os efeitos de outros íons de metal. Os sais de cloreto de Na^+ e de K^+ ou não tinham efeito ou estimularam ligeiramente a atividade de cada enzima, por exemplo, K^+ aumentou a atividade de EG VII por 20%, enquanto Na^+ aprimorou a atividade de EG V por >39%. Ba^{2+} e Ca^{2+} diminuíram a atividade de EG V por 16,5% e

21,5-24,6%, respectivamente, enquanto ambos os íons aumentaram a atividade de EG VI por 37,6% e 10%. Outros cátions divalentes como Cd^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} exerceram um efeito inibitório notável em EG V (perda de atividade de ~26,5-
5 77,4%). Inibição quase total da atividade de todas as três enzimas pelo Hg^{2+} sugere a presença de um grupo tiol essencial envolvido na catálise. Foi observado que a valência modulou a atividade, por exemplo, Fe^{3+} exerceu um efeito negativo mais potente na atividade de todas as três
10 enzimas (35,4-88,0% de diminuição na atividade), em contraste com Fe^{2+} , que efetivamente aprimora a atividade de EG V por 20%, tem efeitos mínimos em EG VII e diminui a atividade de EG VI por 38,6% (Fe^{3+} diminui a atividade de EG VI por 53,6-59,3%). A natureza do contra-ânion, isto é,
15 Cl^- versus SO_4^{2-} teve um efeito profundo na atividade em que ambos os sais de um ânion particular foram investigados. Sais de SO_4^{2-} de Ca^{2+} e de Fe^{3+} aprimoraram seletivamente a atividade de EG VII ~duas vezes e ~4,5 vezes, respectivamente, em relação à atividade observada com o sal
20 Cl^- correspondente. Em contraste, o sal de SO_4^{2-} de Mg^{2+} diminuiu acentuadamente a atividade de EG V (54,2%) e de EG VI (50,1%) em relação ao sal Cl^- do mesmo cátion. Uma seleção de reagentes conhecida como modificadora de amino
25 ácido de grupos R em proteínas foram testados por seus efeitos em EG V, EG VI e EG VII, tanto na ausência como na presença de substrato (efeitos protetores de substrato puderam ser observados desta maneira) (ver a Tabela 6).

Tabela 6

Estudos de modificação química para identificar grupos de amino ácidos essenciais para a catálise em EG V, EG VI, e EG VII

Reagente químico	Enzima + Reagente ^a			Substrato + Reagente ^b		
	EG V	EG VI	EG VII	EG V	EG VI	EG VII
Controle	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
DL-DTT	218,9	514,3	575,0	264,3	915,5	348,6
Ditioerithitol	270,6	657,2	773,8	271,9	917,90	360,9
Dimetilsufoxido	125,5	124,3	194,0	93,6	141,7	100,0
Borohidrido de sódio	96,1	125,0	194,0	81,5	104,8	82,8
Periodatode sódio	181,0	357,1	300,0	283,3	1001,2	469,7
Reagente K de Woodward	162,7	280,0	305,9	121,1	266,7	143,0
Ácido Tioglicólico	211,1	187,1	188,1	148,1	269,0	150,0
o-Ftalaldeído	106,1	100,0	155,0	94,6	139,0	98,8
N-Bromosucinimida (NBS)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
p-Cloromercuribenzoato	125,4	115,4	105,4	89,7	107,1	91,6
p-Hidroxilercuribenzoato	92,8	98,3	99,5	261,7	125,0	94,8

O potente efeito inibitório de N-bromosuccinimida (NBS) sugere o envolvimento de triptofano na ligação e/ou catálise. No entanto, o-ftaldialdeído, outro reagente modificador de triptofano não tem qualquer efeito líquido na atividade de EG V, de EG VI ou de EG VII, portanto, BNS 5 poderia estar modificando outro resíduo de amino ácido com o qual ele é conhecido por ter reatividade lateral, por exemplo, cisteína. Ademais, o fracasso do substrato em proteger contra a inativação da enzima eliminaria um papel 10 direto para o triptofano na ligação ou na catálise. Como a cisteína e o ditioneitol (DTT) ambos protegeram contra a inativação, o efeito de NBS poderá ser devido a reações laterais, por exemplo, a oxidação da cisteína. Os reagentes de sulfidril iodiacetamida, p-hidroximercuri-benzoato e N- 15 etilmaleimida causam pouca ou nenhuma inibição quer na presença ou na ausência do substrato, que pareceria sugerir que EG V, EG VI e EG VII não têm grupos tiol essenciais. No entanto, a cisteína, o DTT e o ditioerithitol ativam todas as três enzimas, especialmente EG VI e EG VII, que poderá 20 sugerir a redução de um dissulfido oxidado talvez durante a extração e/ou purificação da enzima, assim restaurando a conformação nativa da região de sítio ativa da enzima, ou a molécula da enzima como um todo. Borohidrido de sódio, um forte agente redutor, inibe as três enzimas (especialmente 25 EG VI) na presença de substrato. Em contraste, a oxidação de outros grupos reativos no sítio ativo pela ação de agentes de forte oxidação como periodato de sódio, iodina e ácido tioglicólico aprimoram notadamente a atividade de todas as três enzimas com os efeitos sendo mais 30 pronunciados com periodato de sódio e EG VI, na presença de

substrato. O reagente K de Woodward, um reagente modificador de carboxilato aprimorou a atividade de EG V, EG VI e EG VII, sendo mais eficaz na ausência de substrato.

Em geral, substâncias fenólicas, como m-fenilfenol, (-)
5) epicatequina, (+)catequina, ácido o-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido siríngico, e ácido tânico, para citar apenas alguns dos compostos testados, não tiveram um efeito inibidor acentuado na atividade enzimática (na ausência do substrato) com a exceção do
10 ácido tânico que é um inibidor potente devido a sua função precipitadora de proteína. Na verdade, alguns dos compostos, por exemplo, ácido protocatecuico, ácido siríngico, ácido cafeico e polivinilálcool ativaram acentuadamente todas as três enzimas (resultados obtidos
15 durante a pré-incubação da enzima com inibidor na ausência de substrato). No entanto, quando co-incubado com enzima e substrato, vários dos fenólicos foram observados a efetuar uma diminuição na atividade de ~7,32% (o substrato não protegeu nenhuma das enzimas contra o efeito potente do
20 ácido tânico).

Em geral, a maioria dos detergentes testados não resultou em perda da atividade enzimática. No entanto, o ácido taurocólico, o ácido taurodeoxicólico, Tween 20 e Tween 80 todos diminuíram a atividade de EG V, por 47,7%,
25 22,7%, 12,7% e 30,8%, respectivamente, quando pré-incubados com enzima antes do acréscimo do substrato. Com a exceção do Tween 80 (perda de 34,2% de atividade), a incubação simultânea com o substrato restaurou a atividade integral. A atividade aprimorada foi observada quando o substrato, a
30 enzima e detergente (ácido deoxicólico, CHAPS, ácido

taurodeoxicólico e ácido quenodeoxicólico) foram incubados simultaneamente, por exemplo, a atividade de EG VI foi aumentada >2 vezes na presença do substrato e do ácido deoxicólico.

5 Glicosídeos como salicina, esculina e arbutina não tiveram qualquer efeito aparente na atividade de EG V-VII, similar aos dissacarídeos melibiose, maltose, sucrose e o alditol, sorbitol. No entanto, concentrações de celobiose de 50-75 mM inibiram acentuadamente todas as três enzimas, especialmente EG V, que também foi inibida pela lactose a 10 concentrações >75 mM. A lactose também efetuou ~50% de inibição de EG VI e de EG VII a atividade de BBGase a concentrações de ~120 mM. Glucono- δ -lactona e glucoheptono-1,4-lactona também inibem EG V-VII mas a concentrações bem 15 mais elevadas (500 a >750 mM para 50% de inibição).

Especificidade do substrato

Extratos crus de *T. emersonii*, catalisam a hidrólise de uma variedade de polissacarídeos incluindo celulose, CMC, BBG, laminarana, lichenana, xilano, pectina, e um 20 espectro de derivados de glicosídeos sintéticos. Nenhuma das três enzimas purificadas eram ativas contra 4-nitrofenil derivados de β -D-xilopiranosídeo, ou α -D-galactopiranosídeo (Tabela 7).

Tabela 7

25 Especificidades de substrato de EG V, EG VI e EG VII purificados de *Talaromyces emersonii*

Substrato	Ligação	'liquena se' 40,7 kDa	% de Atividade Relativa		
			EG V	EG VI	EG VII

β -glucano de cevada	β - (1,3) (1,4)	100,0	100,0	100,0	100,0
BBG DP misto	β - (1,3) (1,4)	159,0	165,0	230,0	107,6
BBG DP alto	β - (1,3) (1,4)	118,0	249,9	342,8	144,1
CMC	β - (1,4)	0,5 ^c	74,9	58,4	57,7
Liquenana	β - (1,3) (1,4)	118,9	204,3	177,7	166,9
Laminarana	β - (1,3)	0,0	0,0	21,3	18,1
Xilano	β - (1,4)	0,0	1,8	0,7	1,5
Rodimenana (xilano)	β - (1,3) (1,4)	0,0	35,4	9,3	0,0
Pectina	β - (1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
Manan	β - (1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
Avicel	β - (1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
Papel de filtro	β - (1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
4NP- β -D-Glucopiranosídeo	β - (1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
4NP- β -D-Galactopiranosídeo	β - (1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
4NP- β -D-Xilopiranosídeo	β - (1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0

a % de atividade em relação à atividade contra BBG, que é tomada como 100,0%;

b *Talaromyces emersonii* liquenase purificada [6];

c Após 24 horas a 50°C

Ademais, EG V, EG VI e EG VII não exibiram qualquer atividade contra papel de filtro, Avicel, galactomanana de goma de grão de alfarrobeira, e não catalisaram a oxidação de celobiose, mesmo em incubação extensa com substrato. Os

5 resultados são expressos em termos de % de atividade em relação ao controle (atividade contra VVG designado o valor de 100%). Todas as três enzimas exibem atividade máxima contra o β -glucanos de ligação mista, BBG e liquenana, com acentuadamente mais atividade neste último substrato.

10 Atividade de traço exibida por todas as três enzimas com xilano em períodos de incubação extensos poderá ser explicado pelo fato de que a preparação de xilano de aveia Spelts utilizada continha quantidades contaminantes secundárias de β -glucano.

15 Após realizar análise similar em cada uma das enzimas expressas, um sistema de enzima foi projetado utilizando enzimas purificadas de *Talaromyces emersonii* para a degradação de material não-celulósico como folhas de chá, pó de alfarroba e outros materiais similares.

20 A Tabela 8 dá um exemplo das quantidades relativas de atividades enzimáticas diferentes para este sistema de enzima.

Tabela 8

Sistema para conversão de materiais não-celulósicos, por exemplo, folhas de chá, pó de alfarroba

Composição da enzima	Perfil da atividade da enzima (%)
β -glucanase	45,0-55,0
Xilanoase	16,5-42,0
β -glucosidase	0,5-2,0

β -xilosidase	0,1-1,0
Protease	0,1-1,0
Enzimas hemicelulase adicionais incluindo β -galactosidase, esterases, α -glucuronidase, etc.	10,0-18,0

Exemplo 5:

Sistema de *T. emersonii* para converter celulose, dejetos ricos em celulose e celooligosacarídeos

Talaromyces emersonii IMI383751 foi crescida em uma variedade de dejetos de papel e produtos de papel como substrato. As enzimas excretadas foram extraídas e a expressão de enzima foi monitorada e quantificada por análises de proteoma e de transcriptoma e por um espectro rigoroso de ensaios funcionais. Vários dejetos de papel provaram ser excelentes indutores de celulasas (e atividades complementares, por exemplo, enzimas hidrolisadoras de amido, em que produtos de papel revestidos/acabados foram utilizados). Diferenças foram claramente evidentes com relação às quantidades/tipos relativos de enzimas de celulase induzidas por diferentes produtos/dejetos de papel. Os dados obtidos confirmaram que as isoenzimas celobiohidrolase I (CBH I) e celobiohidrolase II (CBH II) foram as atividades de celulase mais importantes e, quando era desejado a mais completa sacarificação/bioconversão da celulose no substrato alvo (por exemplo, geração de matéria prima rica em monosacarídeos para produção de biocombustível), β -glucosidase I (BG I) também foi muito importante.

Placas de papel induziram níveis admiráveis de atividade degradadora do papel de filtro (FP) (1573 IU/g, em que IU representa μ moles de produto formado/tempo de reação em min/substrato indutor g), baixos níveis de endocelulase (27,5 IU/g) e baixos níveis de β -glucosidase (6,05 IU/g). Ao nível de transcriptoma, CBH I foi o mais abundante/altamente expresso celulase, uma observação complementada ao nível funcional com 242,0 IU/g de atividade do tipo CBH I sendo detectada. As enzimas produzidas durante o crescimento em copos de papel eram significativamente mais exo-atuantes, com 495,0 IU/g de atividade FP e 53,9 IU/g de β -glucosidase sendo detectada. Neste último exemplo, a expressão de gene e ensaios funcionais indicaram que CBH II foi a celulase chave (níveis de transcrito e de enzima para CBH II foram ~2 vezes os níveis correspondentes para as enzimas CBH I). CBH II foi novamente a celulase chave induzida por papel marrom, papelão corrugado e papel de escritório branco. Sistemas de enzima individuais, e combinações deles (por exemplo, para a amplificação de atividades chaves ou laterais/acessórias) foram mostradas como sendo ferramentas eficazes para a conversão de celulose (e hemiceluloses/outros carboidratos) em uma ampla variedade de materiais virgens, secundários e de dejetos ricos em celulose.

Enzimas foram isoladas e analisadas por procedimentos convencionais (Walsh (1997) e et al, 2002).

CBH IA, contendo traços de xilanoase como a única atividade contaminante, eluiu a uma concentração de NaCl entre 115 e 170 mM. Frações 52-66 foram reunidas e

dializadas por 16 horas contra 4 mudanças de 100 mM de tampão de acetato de amônia, pH 5,0, e submetido à cromatografia de afinidade em uma coluna (1,4 x 11,3 cm) de CH-Sefarose 4B substituído por p-aminobenzil-1-celobioside.

5 A atividade de xilanoase contaminadora residual não ligou e foi eluída na aplicação e tampões de lavagem. CBH IA foi eluído utilizando 0,1 M de lactose em 100 mM de tampão de acetato de amônia, pH 5,0. Frações 13-21 foram reunidas, dializadas contra água destilada para remover a lactose e
10 armazenada a 4°C até ser utilizada.

CBH IB da etapa de troca de ânion (DE-52 a pH de 5,5) foi dializada verso 100 mM de tampão de acetato de amônia, pH 5,5 e aplicada na coluna de afinidade como para o CBH IA. As atividades contaminantes residuais, essencialmente
15 endoglucanase, não ligaram à matriz de afinidade e foram eluídos na lavagem. CBH IB foi especificamente eluído utilizando 0,1 M lactose em tampão de afinidade. As frações 43-48 foram reunidas e dializadas contra água destilada para remover a lactose e armazenada a 4°C até ser
20 utilizada.

Com base na análise acima, o sistema de enzima seguinte foi projetado utilizando enzimas purificadas de *Talaromyces emersonni* para a degradação de dejetos de papel e produtos de papel, e outros dejetos contendo
25 celooligosacarídeos.

Tabela 9

Sistema para conversão da celulose, dejetos ricos em celulose e celooligosacarídeos

Composição de enzima	Perfil de atividade da enzima (%)

Celobiohidrolase 1A e 1B	5,0-80,0
Celobiohidrolase II	6,0-45,0
Endoglucanase (Cel 45, EG V, EG VI, EG VII)	4,6-66,0
β -xilosidase	0,1-2,5
Outras hidrolases (incluindo enzimas modificadoras de pectina, arabinofuranosidase, β -galactosidase)	1,2-20,5

Exemplo 6: Sistema de espécies fungais termofílicas, *Chaetomium thermophile* e *Thermoascus aurantiacus*

A estratégia delineada para projeto de sistemas de enzimas/composições termozime de *T. emersonii* IMI393751 e
5 mutantes conhecidos anteriormente foi adaptada para a produção de composições modificadores de carboidratos por mais de 23 espécies fungais mesofílicas e termofílicas. Atenção particular foi dada à produção/indução de helicelulase potente (xilanoase, mananase) e sistemas de
10 enzima ricos em pectinase por estas espécies fungais.

Chaetomium thermophile e *Thermoascus aurantiacus* foram cultivados individualmente em fermentação líquida, como descrito anteriormente, no meio de nutriente de *T. emersonii* contendo 1-6% de fonte de carbono indutora
15 (produção de enzima por fermentação sólida também foi investigada). Um sistema de enzima de degradação de manan potente foi obtido pelo cultivo de *C. thermophile* por 96-120 horas em dejetos de café. A composição deste sistema foi caracterizada e mostrada como contendo 45-60% de atividades
20 hidrolizadoras de manan, 0,7-4,0% de enzimas modificadoras

de pectina, 35,2-52,0% de atividades modificadoras de xilano, com o restante sendo atribuído a atividades de celulase (CBY muito baixo ou traço e β -glucosidase foram observados).

5 O cultivo do mesmo fungo em farelo de soja produziu um sistema de enzima xilanolítico potente (70,2-86,5% de atividades totais sendo atribuídas às enzimas modificadoras de xilano); ~10,6-28,0% e ~8,6-22,5% das atividades modificadoras de carboidratos restantes foram atribuídas a
10 celulase, pectinolítica e baixos níveis de enzimas mananolíticas.

De modo similar, um potente sistema de enzima modificador de pectina foi induzido durante o cultivo de *Th. aurantiacus* em farelo de trigo e polpa de beterraba
15 (1:1), com >56,5-80,% do perfil de atividade modificadora de carboidrato total sendo representado pelas atividades pectinolíticas; este sistema de enzima também contém ~22,1-40,1% de enzimas modificadoras de xilano, com o restante sendo essencialmente atividades modificadoras de
20 celulase/ β -glucano. Em contraste, o cultivo de *Th. aurantiacus* em farelo de soja induziu um potente sistema de enzima xilanolítico (>62,1-85,8%), complementado por ~3,5-11,0% de enzimas modificadoras de pectina com as atividades restantes sendo predominantemente modificadoras de β -
25 glucan. Em contraste ao *C. thermophile*, *Th. aurantiacus* não elaborou níveis significativos de enzimas degradadoras de manan durante o cultivo em nenhum dos dois substratos.

Esses sistemas, por eles próprios e em combinação um com o outro ou com outros sistemas de enzima (por exemplo,
30 *T. emersonii*) foram mostrados como efetuando extensa

sacarificação (liberação de açúcar) de uma ampla gama de diferentes materiais agrícolas, alimentos/verduras, bebidas, madeira/papel e outros materiais virgens e de dejetos ricos em carboidratos, e podem ser utilizados para a geração de produtos oligosacarídeos especializados ou materiais primas ricas em açúcar para uma ampla gama de aplicações biotecnológicas (por exemplo, produção de biocombustível).

Exemplo 7: Sistema de *T. emersonii* para a geração de matérias primas ricas em açúcar de alimentos/bebidas, papel e dejetos madeirosos, a serem utilizados na produção de biocombustível.

(a) Bioconversão de um dejetos de alimentos/bebidas: polpa/bagaço de maçã

Dejetos de maçãs (em polpas), polpa e bagaço de maçã foram obtidos de fornecedores de frutas locais, e fornecedores de produção de cidra/bebidas. *T. emersonii* foi cultivado em 2-6% de bagaço/polpa de maçã (ambos por fermentação sólida e líquida) e altos níveis de uma gama de enzimas modificadoras de carboidrato foram mensuradas. Este sistema foi caracterizado por altos níveis de hidrolases de β -glucanos, principalmente β -glucanases não celulósicas (~27,4% em 120 horas de filtrados de cultura líquida), quantidades substanciais de exo-glicosidases chaves com níveis especialmente elevados de α -arabinofuranosidase (13,3% da atividade de carbohidrase total) e β -galactosidase (22,6%). Enzimas de esterase, pectina e xilano-modificadoras adicionais também foram detectadas (>7,2-33,5%). Assim utilizando a análise acima, é possível projetar um sistema de enzima adequado para degradar dejetos

de maçã.

Os estudos iniciais utilizaram um carregamento de enzima que continha 2.344 nkat xilanoase, 5.472 nkat de β -glucanase ligado misto e 8.529 nkat de liquenanasase por substrato de 3,6 Kg e uma temperatura de reação de 70° foi utilizada. A pasteurização completa do hidrolisado foi alcançada a 70°C, e o hidrolisado foi utilizado para alimentar reatores anaeróbicos de fluxo ascendente termofílico (UAHR), 100% de utilização da matéria prima de açúcar foi observada, com produção concomitante de metano (50-70% no fluxo de biogás). Estudos de otimização subseqüentes foram conduzidos, que demonstraram que a incubação a 80°, com agitação suave (~12,6 rad/s) por um período de 24 horas com aproximadamente 2/3 da dosagem de enzima original, atingiu ~87% de sacarificação dos carboidratos presentes para açúcares simples e fermentáveis.

Os açúcares produzidos por este sistema de enzima podem ser utilizados como matéria prima rica em monossacarídeos para a produção de biocombustível.

(b) Bioconversão de dejetos de papel: copos de papel e produtos do papel

T. emersonii foi cultivado sem suplementação em uma variedade de dejetos de papel em fermentação líquida (ver Exemplo 5). Copos de papel provaram ser indutores de carbohidrase muito eficientes, produzindo um coquetel de enzimas multi-componentes potente com altos níveis de xilanoase e atividades enzimáticas degradadoras de amido, e níveis de atividades de celulase mais elevadas do que a reportada em substratos de crescimento convencionais.

O potencial deste sistema de enzima para liberar com eficiência açúcares de redução e efetuar a degradação de dejetos de papel foi claramente ilustrado por testes bioquímicos e microscopia eletrônica de varredura. O efeito do tratamento de termozima na integridade e morfologia do substrato utilizando a microscopia eletrônica de varredura para confirmar o potencial desses coquetéis como ferramentas biotecnológicas potentes para a conversão de dejetos de papel. SEM forneceu provas claras para a degradação de fibra de celulose extensa (perda completa da estrutura da fibra em certas amostras) após o tratamento do substrato rico em celulose com os coquetéis de *T. emersonii*.

O coquetel de enzimas produzido pelo *T. emersonii* após 108 horas de crescimento em copos de papel contém uma bateria de enzimas degradadoras de celulose, hemicelulose e amido e estudos de sacarificação conduzidos com este coquetel multi-componente demonstra sua capacidade de liberar com eficácia glicose e outros açúcares de redução dos substratos convencionais de celulose e dejetos de papel. Este coquetel de enzimas foi verificado como sendo ativo em todos os substratos de dejetos de papel e de celulose convencional analisados. Embora todos os substratos tenham sido crescentemente degradados com o tempo, diferentes susceptibilidades à biodegradação foram exibidas em resposta às diferentes composições de substrato.

Antes de qualquer pré-tratamento a embalagem biodegradável mostrou a susceptibilidade mais forte no sentido da hidrólise enzimática seguida de lenço de papel,

copos de papel e papelão corrugado. O sistema de enzima induzido por copo de papel funciona otimamente, liberando níveis de açúcar máximos de dejetos de papel, a uma temperatura de 50°C, pH de 4,5, a uma dosagem de enzima de 4 mL/g de substrato e enquanto agita a 3,9 rad/s. A homogeneização dos copos de papel aumentou o nível de hidrólise por 2,3 vezes. Sob essas condições experimentais (dosagem de enzima de 36 FPU) (unidades de filtro de papel) uma hidrólise porcentual total de 85% foi alcançada, com a glicose sendo responsável por ~80% dos açúcares de redução liberados. A glicose e a xilose foram os principais produtos liberados (ver a Figura 3). No entanto, diminuir a dosagem de enzima para 9 FPU efetuou uma hidrólise geral de ~76%. A microscopia eletrônica demonstrou as excelentes propriedades hidrolíticas deste coquetel (Figura 4).

O tratamento por calor aumentou a conversão do papelão pelo mesmo sistema de enzima, por um fator de 34% (uma hidrólise de carboidrato geral com base em açúcares de redução liberados de ~88%), enquanto a combinação tanto do tratamento por calor como homogeneização aumentou os açúcares de redução liberados por 80%, produzindo 1,47 mg/ml de glicose (31,7% dos açúcares totais liberados). Pratos de papel foram degradados rapidamente pelo coquetel de enzimas induzido por copos de papel, com a glicose apresentando ~67% dos açúcares totais liberados.

A sacarificação enzimática de dejetos de papel e de alimentos foi investigada em Hidrólise Sequencial e Sacarificações (SHF), isto é, pré-tratamento por enzimas seguido por fermentação por levedura para produzir etanol, e em Hidrólise Simultânea e Sacarificação (SSF), em que a

matéria prima é continuamente gerada e imediatamente fermentada pela levedura. As temperaturas de reação pré-tratamento enzimático são diferentes em ambos os processos, isto é, mais alto em SHF à medida que o hidrolisado é resfriado antes da fermentação, e a uma temperatura próxima das temperaturas ambiente para o crescimento da levedura e a fermentação em SSF. Embora as enzimas de *T. emersonii* IMI393751 sejam mais eficientes e com taxas de reação mais altas, e a pasteurização é alcançada (e menos enzima é necessária), as enzimas *T. emersonii* ainda funcionam bastante bem a 25-37°C e comparam bem com preparações de enzimas comerciais de outras fontes fungais. As matérias primas ricas em açúcar produzidas verificaram-se ser adequadas para a produção de biocombustível (bioetanol e biogás).

(c) Bioconversão de resíduos de madeiras moles para a produção de bioetanol

Resíduos madeirosos e dejetos de fontes primárias e secundárias (por exemplo, cascas, gravetos, e dejetos de processamento, como cepilhas e pó de serra) representam um amplo recurso com até 65-70% de seu peso seco compreendendo carboidratos complexos como hemicelulose (~19-28% e essencialmente xilanos e mananas com alguns outros polisacarídeos) e celulose (~39-46%), que estão envoltas em lignina.

T. emersonii IMI383751 foi crescido em fermentação líquida ou de estado sólido, em resíduos madeirosos, como pó de serra de espruce sitka e cepilhos de cinza para gerar sistemas de enzimas com o perfil aproximado de enzimas para conversão do dejetos alvo. Diferentes temperaturas de

reação/pré-tratamento e dosagens de enzimas foram investigados. Os sistemas de enzima avaliados incluíram coquetéis obtidos durante o crescimento de *T. emersonii* em uma variedade de substratos. Temperaturas de reação de 5 50°C, 60°C, 70°C e 80°C foram investigadas, e um número de substratos diferentes foi utilizado, isto é, resíduos madeirosos não tratados e pré-tratados. O carregamento da enzima também foi investigado, com estudos iniciais iniciando com 60 FPU, posteriormente aumentado até 200 FPU 10 (FPU: unidades de papel de filtragem, uma medida da atividade de celulase total).

Tabela 10

Sacarificação de resíduos madeirosos por *T. emersonii*
(coquetel WB/BP (1:1))

Dosagem	Temp	Pó de serra de espruce Sitka			Pó de serra de espruce Sitka grosseiramente maquinado		
		%Hid	%Conv	Hexose (g)	%Hid	%Conv	Hexose (g)
60 FPU	50°C	34,3	40,9	0,39	35,2	27,0	0,24
60 FPU	80°C	44,3	50,6	0,49	48,1	39,5	0,38
60 FPU de mistura	50°C	48,7	62,3	2,95	41,8	35,1	1,87
60 FPU de mistura	80°C	62,4	79,1	3,45	55,9	65,2	3,1

15 Teor de hexose é dado como g liberada de um lote inicial de 10 g em período de relação de 24 horas

- Mistura = coquetel de *T. emersonii* WB/BP 1:1 + dejetos

de café induzido de *C. thermophile*

- A hidrólise sob condições untampãoed e tampãoed foi investigada, como foi o efeito de níveis de umidade de reação e dosagem de enzima

5 Os efeitos da dosagem da enzima nas produções teóricas de etanol são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11

Efeito da dosagem de enzima em % de conversão e produção teórica de etanol

Enzima	Dosagem (FPU)	Temperatura de reação	Hexose liberada (g)	% de conversão	Produção teórica de etanol (L/ton de matéria prima)
Mistura*	60	70°C	4,5	70,0	325,5
Mistura*	200	70°C	5,1	76,4	345,4

10 *Mistura = *T. emersonii* (coquetel WB/BP (1:1)) + dejetos de café induzido de *C. thermophile*; Teor de hexose é dado como g liberado de um lote inicial de 10 g em um período de reação de 24 horas

Exemplo 8: Sacarificação de biomassa madeirosa

15 **Preparo do substrato de teste:** Pastilhas de espruce (2-10 mm de diâmetro) foram impregnadas com dióxido de enxofre (3% m/v umidade) por 20 minutos à temperatura ambiente a uma taxa de absorção de 2,5% w/w de umidade. O espruce tratado com SO₂ foi tratado com vapor a 215°C por 2
20 a 5 minutos. O teor de hemicelulose foi quase que

completamente hidrolizado; a recuperação de sólidos foi de 60-65% da matéria prima inicial.

Enzimas MGBG Termoenzimas: Numeradas MGBG1, MGBF2, MGBG3 e MGBG4. As enzimas comerciais utilizadas foram
5 Celluclast 2L de T. reesei e Novozym 188 de A. Níger (Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Dinamarca).

Avaliação da hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática padrão foi realizada a 37°C, 50°C e a 60°C em 300 mL, em vasos de reação de 1L e de 10L,
10 com agitação a ~13,6 rad/s. A dosagem de enzima foi de 32FPU de cada preparo de enzima por g de celulose em uma solução de substrato com tampão (Gillera, 2004). O pH do tampão da reação foi ajustado para pH 5,0 para as enzimas MGBG e pH 4,8 para as preparações comerciais. Amostras
15 foram removidas a intervalos cronogramados e a ação enzimática foi terminada ao ferver cada mistura de reação (e controles) por 10 minutos. Nas temperaturas de reação mais baixas (37-50°C), duas das preparações de enzimas da invenção efetuam tão bem quanto a preparação Celluclast
20 comercial, e (ii) o desempenho de 3 das enzimas MGBG está na mesma faixa que o Celluclast comercial (e a mistura Celluclast/Novozym).

A produção de glicose utilizando a composição da invenção foi similar às preparações comerciais otimizadas,
25 mas elas produzem níveis mais altos de açúcares fermentáveis adicionais do que as enzimas comerciais.

As preparações de enzima da invenção tiveram desempenho superior às enzimas comerciais/misturas comerciais nas condições de reação mais elevadas (60-70°C),
30 em termos da extensão de hidrólise geral, produção do

produto e estabilidade da enzima. Uma dosagem de enzima mais baixa poderia ser utilizada às temperaturas de reação mais altas para atingir um desempenho de hidrólise similar (dependendo da preparação da enzima, apenas 62,5-78% do carregamento da enzima comercial é necessário). Elas também são menos afetadas por substâncias inibitórias presentes no substrato pré-tratado por vapor e concentrações mais altas de glicose e de celobiose nos hidrolisados ricos em açúcar. Elas também produzem uma quantidade maior de açúcar em 24 horas a 60°C do que as enzimas comerciais atingem em 72 horas a 50°C, a temperatura de trabalho ótima para as enzimas comerciais.

Os resultados chave para a hidrólise enzimática são apresentados na Tabela 12, enquanto as melhores combinações de temperatura de reação/tempo de reação para um percentual de hidrólise ótimo, para cada uma das composições comercial e de enzima da invenção testada são dadas na Tabela 13.

Tabela 12

Resumo dos resultados da comparação do desempenho enzimático/potencial hidrolítico das preparações de enzima comercial e MGBG em espruce pré-tratado

Temperatura de reação (°C)	Tempo de reação (hora)	Pontos terminais / Produtos (g/L)	Cellul clast	Cell+ Novozym (24:4)	MGBG 1	MGBG2	MGBG3	MGBF4
50°C	24 h	Hexose	7,33	13,85	6,8	11,9	3,84	8,64
		Pentose	0,83	0	1,1	1,93	0,59	1,33
		Cellobios e	2,58	0	1,22	2,14	1,28	2,88
		%Hidrólisis e*	40,2	51,9	34,1	59,8	21,4	48,1
	48 h	Hexose	14,1	20,4	14,4	15,75	7,7	15,55
		Pentose	1,59	1,1	2,34	2,55	1,18	2,52

		Cellobios e	4,96	0,6	1,01	0,3	2,57	0,35
		%Hidrólisis e	77,3	82,7	66,6	69,6	42,9	69,0
	72 h	Hexose	12,98	20,8	21,2 5	21,48	9,16	20,84
		Pentose	2,26	2,34	3,4	3,47	1,40	3,88
		Cellobios e	1,33	0,3	0,93	0,12	3,05	0,16
		%Hidrólisis e	62,0	87,8	95,8	93,9	51,0	91,3
60°C	24 h	Hexose	4,18	3,74	20,5 5	22,12	4,65	10,46
		Pentose	0,47	0,31	2,1	1,87	0,71	1,49
		Cellobios e	1,47	0,17	3,69	1,34	1,55	3,61

		%Hidrólís	22,9	15,8	98,6	94,8	25,9	58,3
		e*						
	48 h	Hexose	8,04	11,86	22,71	23,02	9,32	17,38
		Pentose	0,9	0,63	2,47	2,55	1,43	2,67
		Cellobios	2,83	0,34	1,31	0,39	3,11	5,80
		e						
		%Hidrólís	44,1	48,0	^100,0	97,2	51,9	96,8
		e						
	72 h	Hexose	12,98	14,80	23,51	23,33	12,56	21,9
		Pentose	2,26	1,33	2,53	2,67	1,92	2,43

Tabela 13

Combinações de temperatura de reação/tempo de reação para máxima porcentagem de hidrólise, para cada uma das enzimas comerciais e MGBG investigadas

Preparação de enzima	Temp de reação ótima (°C)	Tempo de reação ótimo (h)	% de hidrólise	g/L Hexose
Celluclast	50,0	48 h	77,3	14,1
Cell+Novozym (24:4)	50,0	48 h	82,7	20,4
	50,0	72 h	87,8	20,9
MGBG1	50,50	48 h	66,6	14,45
	50,0	72 h	95,8	21,25
	60,0	24 h	98,6	20,55
	70,0	24 h	99,4	21,72
MGBG2	60,0	24 h	94,8	22,12
	70	24 h	~100,0	24,11
MGBG3	70,0	24 h	93,25	16,8
MGBG4	70,0	24 h	97,0	20,98
	70	48 h	96,8	17,38

5 Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)

Experimentos SSF em lote com hidrolisado de espruce foram realizados para comparar o desempenho de diferentes preparações de enzima. A fermentação foi realizada a uma

concentração de fibras de espruce de 4%, o material pré-tratado foi diluído com água estéril na concentração desejada. O pH foi mantido em 5,0 com o acréscimo de NaOH 2M. A temperatura de fermentação foi de 37°C e a velocidade do misturador foi de 52,3 rad/s. O meio reator foi espargido com nitrogênio (600 ml/min) e o teor de CO₂ foi medido com um analisador de gás. A preparação de enzima foi acrescentada diretamente no fermentador a uma carga de 25 unidades de papel de filtragem (FPU)/g de celulose. O meio de fermentação foi suplementado com nutrientes: 0,5 g/l (NH₄)₂HPO₄, 0,025 g/l MgSO₄.7H₂O e 1,0 g/l de extrato de levedura (levedura de padaria, *Saccharomyces cerevisiae*) massa celular acrescentada foi de 5 g/l e todos os experimentos SSF foram realizados a 37°C por 72 horas. Amostras foram retiradas a vários intervalos de tempo, foram centrifugadas em tubos de microcentrífugas de 1,5 ml a 14.000 g por 5 minutos (Z 160 M; Hemle Labortechnik, Alemanha), o sobrenadante foi então preparado para a análise HPLC.

Os produtos da hidrólise gerados durante a degradação de materiais lignocelulósicos foram analisados por HPLC. Celobiose, glicose, xilose, galactose, manose, HMF e furfural foram separados em uma coluna de polímero (Aminex HPX-87P) a 85°C, a fase móvel foi miliporo de água a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min. Concentrações de etanol, glicerol e acetato foram determinadas utilizando uma coluna Aminex HPX-87H a 60°C utilizando um sistema HPLC Shimadzu equipado com um detector de índice refrativo. A fase móvel foi uma solução aquosa de 5 mM de H₂SO₄ a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min. O etanol produzido também foi determinado

utilizando um ensaio ligado à enzima (r-Biopharm, Alemanha).

O crescimento da levedura ocorre em duas fases. O dióxido de carbono é um sub-produto importante do processo de fermentação de etanol pois a fermentação anaeróbica de um mol de glicose produz um mol de etanol e dois mols de dióxido de carbono. Portanto, a medição da concentração de dióxido de carbono na saída de gás é uma medida indireta da taxa de fermentação. Na primeira fase de crescimento a glicose disponível é consumida e etanol é formado, e a resposta rápida inicial à glicose presente é representada por um pico na evolução de CO₂.

Os resultados obtidos durante a SSF são dados na Tabela 3. Como foi mencionado anteriormente, o tempo total tomado para o SSF, para cada preparação de enzima foi de 72 horas, e a temperatura utilizada para o SSF foi de 37°C. A eficiência da fermentação foi determinada ao dividir a concentração efetiva de etanol produzido (g/L) pelo etanol teórico total (g/L) que seria produzido se todo o substrato disponível fosse convertido a açúcar solúvel e fermentável e todo o açúcar fosse convertido para etano, e multiplicar por 100.

Com base nos dados obtidos, a produção de etanol para cada combinação de enzima/SSF são dadas em L etanol/tonelada seca, e as unidades americanas correspondentes, galões de etanol/tonelada seca americana.

Tabela 14

Resumo dos experimentos com SSF

Preparação	g/L	Eficiência	Produção	Produção	Custo da
o da	etano	a da	o de	de etanol	enzima

enzima	l	fermentaça ão (%)	etanol (L/ton)	(galões/to n)	(US\$/ton
Cell+ Novo (24:4) n°1	5,83	54,0	178,78	51,85	Não Disponíve l
Cell+ Novo (24:4) n°2	9,10	84,3	279,05	80,52	Não disponíve l
MGBG1*	5,02	46,5	153,88	44,62	~17 US\$
MGBG1	7,33	67,9	224,62	65,14	~21,76 US\$
MGBG2*	7,24	67,1	221,89	64,35	~23 US\$
MGBG2	7,89	73,1	241,79	70,12	~23 US\$
MGBG3**	8,62	79,9	264,46	76,69	~17,4 US\$
MGBG4**	9,67	89,6	296,37	85,95	~15,4 US\$
* Carregamento de enzima de 21,3 FPU utilizado em vez de 32,0 FPU					
** Misturas mais otimizadas de MGBG3 e de MGBG4.					

Exemplo 9

Comparação das enzimas comercial e MGBG em uma estratégia de hidrólise e fermentação (SHF) para a produção de bioetanol

As produções de bioetanol obtidas pela hidrólise e fermentação seqüencial, foram investigadas para as preparações comercial e da enzima da invenção. Uma vantagem do SSF é que o processo consiste de uma fermentação rápida inicial e metabolismo dos açúcares monoméricos resultantes da etapa de pré-tratamento. Uma vez liberada a glicose do substrato pela ação das enzimas hidrolíticas que foram acrescentadas, a fermentação é rápida, o que significa que, no SSF, a concentração de açúcares livres sempre permanece baixa. No SSF, a taxa de fermentação eventualmente diminui como resultado quer de uma diminuição na taxa de conversão do substrato pelas enzimas, ou a inibição do metabolismo da levedura, seja qual for aquela cuja taxa é limitante. Os dados obtidos nesses experimentos estão resumidos na Tabela 15.

Tabela 15

Resumo dos experimentos SHF

Preparo da enzima	Temp e tempo da hidrólise	g/L etanol	Eficiência da fermentação (%)	Produção de etanol (L/ton)	Produção de etanol (galões US/ton)	Custo da enzima (US\$/ton)
Celluclast	50°C por 48 horas	7,21	66,8	220,94	64,8	Não disponível
Cell+Novo (24:4) nº1	50°C por 48 horas	9,35	86,7	286,7	83,15	Não disponível
Cell+Novo (24:4)	50°C por 48 horas	10,42	96,6	319,53	92,66	Não disponível

nº2	horas					el
MGBG1	60°C por 24 horas	10,50	93,37	321,98	93,37	~US\$21,7 6
MGBG1*	70°C por 24 horas	11,10	~100,0	340,38	98,71	~US\$21,7 6
MGBG2	60°C por 24 horas	11,30	~100,0	346,51	100,5	~US\$21,8
MGBG2*	70°C por 24 horas	12,32	~100,0	377,79	109,6	~US\$21,8
MGBG3 [§]	70°C por 24 horas	8,59	79,6	263,26	76,3	US\$21,4
MGBG4	70°C por 24 horas	10,72	99,4	328,73	95,33	US\$21,4
* Preparação da enzima utilizada a uma temperatura de reação mais alta.						
§ Este coquetel de enzimas é particularmente eficaz na liberação de açúcares fermentáveis de substratos ricos em hemicelulose e não se esperaria que fosse tão eficaz em um substrato que tem uma parte significativa da fração de hemicelulose removida (etapa do pré-tratamento).						

A análise HPLC confirmou que os principais produtos formados são monossacarídeos (açúcares únicos) com quantidades muito pequenas de oligômeros mais altos

formados (celobiose, que é um dissacarídeo, sendo o principal, ou único, açúcar de cadeia mais alta presente nos hidrolisados).

Exemplo 10: Aplicações em rações para animais

5 Cada composição de enzima foi avaliada em aplicações alvo individuais, com estudos modelos conduzidos em escala de laboratório com 5-25 g do substrato (cereal, farinha de cereal ou outro resíduo de planta) em volumes de reação final de 50-250 mL, a um pH entre 2,5-7,0 e 37-85°C, com ou
10 sem agitação. O desempenho da enzima foi avaliado com e sem pré-tratamento do substrato, isto é, pré-tratamento com vapor suave (105°C, 8 p.s.i. por 5 minutos), moenda usando um pilão e armação, homogeneização em um homogeneizador Parvalux ou Ultraturrax. Para frutas moles e
15 tecidos/resíduos de vegetais, o substrato foi macerado grosseiramente por mistura, e incubado com a enzima, sem pré-tratamento. A hidrólise do substrato foi monitorada por (i) medição dos açúcares de redução liberados e ensaios para detectar e quantificar açúcares individuais, (ii)
20 análise HPLC e TLC confirmatória dos produtos de açúcar da hidrólise, (iii) análise da redução do peso/volume do resíduo, (iv) comparação do teor da celulose, da hemicelulose, do amido e da pectina antes e após o tratamento enzimático, e (v) análise física da degradação
25 do substrato por microscopia eletrônica de varredura (SEM) para substratos fibrosos como papel e dejetos madeirosos.

Tabela 16

Coquetel	Composição do coquetel	Aplicação alvo	Substrato	Temperatura de tratamento ótima (°C)	Produtos
MGBG15	CBHI (25-30%) CBH2 (1-5%) β (1,3)4-Glucanase (10-15%) β -glucosidase (2-10%) Xilanoase (44-48%) 0,1-1,5% de β -Xilosidase 0,1-2,0% de α -Glucuronidase 0,1-1,5% de α -L-arabinofuranosidase 2-5% de enzimas	Digestibilidade aprimorada	Trigo, aveia	>60°C 75°C)	Principalmente glucooligosacarídeos, xilooligosacarídeos, e alguma outra quantidade secundária de açúcares diversos

	pectinolíticas, e esterases				
	7-15% de protease				
MGBG16	CBHI (10-15%) CBHII (10-15%) β (1,3)4-glucanase (25-30%) β -glucosidase (2-8%) Xilanoase (25-30%) 1-2,0% de β - Xilosidase 1-2,0% de α - Glucuronidase 0,1-2,0% de α -L- arabinofuranosidase 5-10% de enzimas pectinolíticas, ~5% de atividade	Digestibil idade aprimorada Alimentos enriquecid os em Galacto- e Glucooligo sacarídeos Liberação de antioxidan te	Trigo; aveia; centeio	60°C (até 80-85°C)	Galactooligosacar ídeos glucooligosacaríd eos e xilooligosacaríde os

	modificadora de amido					
	5-10% de oxidoreductase/oxidase e esterases					
	10-15% de protease					
MGBG17	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (20-30%) β -glucosidase (2-8%) Xilanoase (30-35%) 1-2,0% de β -Xilosidase 1-3,0% de α -Glucuronidase 1,5-4,0% de α -L-arabinofuranosidase	Digestibilidade aprimorada	Trigo; aveia, centeio; milho, cevada; canola	>60°C (até 80°C)	(até	Glucopolissacarídeos e xilopolissacarídeos

	5-10% de enzimas pectinolíticas 5-8% de atividade modificadora de amido 1-4% de oxidoreductase/oxidase e esterases 18-25% de protease				
MGBG13	CBH I (5-19%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (25-40%) β -glucosidase (~5%) Xilanoase (18-25%) 1-2,0% de β -Xilosidase 1-3,0% de	Digestibilidade aprimorada Liberação de antioxidante	Trigo; aveia; centeio; milho; cevada; canola	>60°C 85/90°C	(até Glucooligosacarídeos, e xilooligosacarídeos alguns monossacarídeos e dissacarídeos de polímeros de

	Exoxilanoase 8-10% de α - Glucuronidase 1,5-5,0% de α -L- arabinofuranosidase 10-15% de enzimas pectinolíticas 5-7% de atividade modificadora de amido 5-10% de outras hemicelulases 1-4% de oxidoreductase/ oxidase e esterases 8-12% de protease				pectina (por exemplo, arabinoooligosacar ídeos, ácido galacturônico, ramnose, etc.)
MGBG19	CBH I (10-15%) CBH II (10-15%)	Digestibil idade	Sorgo; Canola;	>60°C (até 80- 85°C)	Glucoooligosacaríd eos,

	β(1,3)4-glucanase (25-30%) β-glucosidase (~10-15%) Xilanoase (20-27%) 4,0-7,0% de β-Xilosidase 5-10% de Exoxilanoase 1-4% de α-Glucuronidase 2,0-5,0% de α-L-arabinofuranosidase 5% de enzimas pectinolíticas ~5% de atividade modificadora de amido	aprimorada Flexibilidade para uso em alimentos diferentes	também outros cereais, por exemplo, trigo. aveia; centeio milho; cevada	e xilooligosacarídeos, alguns monossacarídeos ou alguma outra quantidade menor de açúcar de polímeros pépticos
--	--	--	--	---

	5% de outras hemicelulases 1-4% de oxidoreductase/oxidase e esterases ~25% de protease				
MGBG20	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (20-32%) β -glucosidase (~2-9,5%) Xilanoase (15-25%) 15-20% de β -Xilosidase 10-15% de Exoxilanoase 2-5% de α -	Digestibilidade aprimorada	Trigo, Cevada e centeio	>60°C (até 80-85°C)	Glucopolissacarídeos, xilopolissacarídeos, alguns monossacarídeos ou alguma outra quantidade menor de açúcar de polímeros pectínicos

	Glucuronidase 1,5-5,0% de α -L-arabinofuranosidase 10-15% de enzimas pectinolíticas ~10% de atividade modificadora de amido 5% de outras hemicelulases 2-5% de oxidoreductase/oxidase e esterases ~7-10% de protease				
MGBG21	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (15%)	Digestibilidade aprimorada Liberação	Trigo; centeio e milho; também	>60°C (até 80-85°C)	Glucopoligosacarídeos, e xilopoligosacarídeos

	β-glucosidase (~2-10%) Xilanoase (50-55%) 1-5% de Xilosidase 5-10% de Exoxilanoase 1-4% de α- Glucuronidase 2-5% de α-L-arabino- furanosidase 20-25% de enzimas pectinolíticas 4-6% de atividade modificadora de amido 7-10% de outras hemicelulases 2-4% de	de Fructoolig osacarídeo s	polpa de beterraba		os, alguns monossacarídeos ou alguma outra quantidade menor de açúcar de polímeros pécticos e de fructooligosacari deos
--	--	---	-------------------------------	--	--

	oxidoreductase/ oxidase e esterases ~10% de protease				
MGBG22	CBH I (~5%) CBH II (~5%) β (1,3)4-glucanase (27-45%) β -glucosidase (~1-5%) Xilanoase (16-25%) 0,5-4% de Xilosidase ~10% de Exoxilanoase 0,5-4% de α - Glucuronidase 1-5% de α -L-arabino- furanosidase 5-10% de enzimas pectinolíticas	Digestibil idade aprimorada Formação de glucooligo sacarídeos	Trigo, centeio, cevada	>60°C (até 85-90°C)	Glucooligosacarí eos, xiloooligosacaríde os, alguns monossacarídeos ou alguma outra quantidade menor de açúcares, etc.

	4-8% de atividade modificadora de amido 8-10% de outras hemicelulases 1-4% de oxidoreductase/oxidase e esterases ~5-6% de protease				
MGBG23	CBH I (~3-6%) CBH II (~3-6%) β (1,3)4-glucanase (35-45%) β -glucosidase (~3-6%) Xilanoase (~30%) 0,5-2,0% de Xilosidase	Digestibilidade aprimorada Glucooligo sacarídeos, xilooligo sacarídeos Alto potencial	Trigo, cevada, centeio	>60°C (até 85-90°C)	Glucooligosacarídeos de baixo DP, xilooligosacarídeos, com monossacarídeos significativos ou alguma outra quantidade menor

	~2-5 de Exoxilanoase 0,5-2% de α - Glucuronidase 1-5% de α -L-arabino- furanosidase 5-10% de enzimas pectinolíticas 2-4% de atividade modificadora de amido ~10% de outras hemicelulases 6-10% de oxidoreductase/ oxidase e esterases ~8-10% de protease	de liberação de anti- oxidante			de açúcares, etc.
--	---	---	--	--	-------------------

Para alimentos enriquecidos em oligosacarídeos chaves,
por exemplo:

Galactooligosacarídeos - coquetel de enzimas MGBG 16 é
melhor

5 Glucooligosacarídeos - MGBF 16 e 22 são os melhores

Fructooligosacarídeos - coquetel MGBG 21 é o melhor

Para as preparações de alimentos enriquecidos por
antioxidantes, os melhores coquetéis a usar para tratamento
são aqueles preparados com: MGBG 13, 16 e 23.

10 **Exemplo 11: Aplicações de alimentação de animais
monogástricos:**

Estudos foram realizados a temperaturas acima da faixa
de 50-85°C (com agitação a 14,7 rad/s), com frações de
cereais grosseiros (lotes de 1-5 g). A hidrólise de
15 carboidratos no substrato, por cada preparação de enzima
dosagem máxima de 0,5 IU por g de substrato), foi
monitorada durante 24 horas ao quantificar os açúcares
reduzidos liberados, e os produtos formados em amostras
removidas da mistura de reação a intervalos periódicos.

Tabela 17

Coquetel	Composição do coquetel (%)	Aplicação alvo	Substrato	Temperatura de tratamento ótima (°C)	Produtos
MGBG24	CBHI (1-5%) CBH2 (1-5%) β (1,3)4-Glucanase (27-43%) β -glucosidase (2-10%) Xilanoase (44-48%) 0,1-0,4% de β -xilosidase 0,1-3,0% de α -Glucuronidase	Digestibilidade aprimorada Produção de baixa pentose, alimentos com base em cereais facilmente digeridos para aves e	Cevada, Milho, Trigo, Aveia. Dietas de cevada-soja. Dietas de milho-trigo-soja. Dietas de trigo-centeio-soja.	>60°C (até 85°C)	Principalmente glucooligosacarídeos, xilooligosacarídeos, e alguma outra quantidade secundária de açúcares diversos. Alguns dos produtos de oligosacarídeos (e peptídeos)

	0,1-0,4% de α -L-arabinofuranosida se 5-10% de enzimas pectinolíticas, e esterases 20-25% de protease	suínos, em que as propriedades de ligação de água do β -(1,3)1,4-glucanos viscoso foi reduzida por fragmentação enzimática			teriam propriedades de alavancar a saúde.
MGBG17	Como antes				
MGBG25	CBH I (0,5-2,5%) CBH II (0,5-2,5%) β (1,3)4-glucanase (15-20%) β -glucosidase (4-10%)	Digestibilidade aprimorada. Produção de baixa pentose,	Cevada. Aveia, Centeio	>60°C (até 85°C)	Essencialmente glucooligosacarídeos, xilooligosacarídeos (DP 2-6)

[illegible]

Hidrólise significativa do xilano e da fração de β -glucano não-celulósica foi observada, que resultou na formação de produtos oligosacarídeos de cadeia média a mais longa da hidrólise, que também seriam substratos de fermentação adequados para microorganismos probióticos.

Produção de biogás de exemplo

Dois reatores híbridos anaeróbicos de fluxo ascendente de 10 L (UAHR; Reynolds, 1986), um mantido a 37°C e o outro a 55°C foram utilizados para a produção de biogás por populações mistas individuais de bactérias mesofílicas e termofílicas, respectivamente. O hidrolisado rico em açúcar foi bombeado através da cama de lama e degradado pelas comunidades de microorganismos presentes. Um dispositivo separador no topo do reator foi utilizado para separar o gás produzido de qualquer partícula de lama que possa haver sido solta durante a digestão anaeróbica. Ambos os reatores foram avaliados continuamente por todo o período de operação de 650 dias ao monitorar a eficiência da remoção de COD (APHA, 1992), redução de carboidratos totais (método de Dubois) e produção de metano. A produção de ácidos graxos, um indicador do metabolismo do açúcar, e a produção de metano foram monitoradas por cromatografia gasosa (GC).

O biocombustível pode ser produzido de um número de matérias primas. Muitas delas exigem a utilização de diferentes coquetéis de enzimas. MGBG 16 é o melhor coquetel para a produção de matérias primas dos dejetos alimentares e de vegetais listados abaixo para a produção de biogás pela digestão anaeróbica.

Tabela 18

Coquetel de tratamento	Resíduo de dejetos utilizado	Principais açúcares liberados	Digestão anaeróbica mesofílica % de redução de carbono	Digestão anaeróbica termofílica % de redução de carbono	Digestão anaeróbica mesofílica % de metano no biogás	Digestão anaeróbica termofílica % de metano no biogás
MGBG16	Alfarroba	Xilose, glicose manose. celobiose	99-100	94,0-96,6	58,0	49,0
	Pão	Xilose, Xilobiose, Glicose, Celobiose	96,1-99,7	96,0-99,3	71,9	69,0
	Bagaço de maçã	Glicose, Ácido	96,0-99,3	95,4-99,5	58,0	52,0

		galacturônico, Frutose, Arabinose, Galactose, Xilose					
	Papelão	Xilose, Glicose (traço de oligos mais elevados)	95,4-96,9	94,0-96,6	63,0	49,0	
MGBG18	Dejetos mistos vegetais/frutas (restaurante)	Xilose, Glicose, Ácido galacturônico, Frutose, Arabinose, Galactose Ramnose					

* A porcentagem de metano no biogás normalmente é de 50-65% máximo.

Os dados na Tabela 18 foram alcançados com tempos de retenção de apenas 3 dias, em contraste com relatórios na literatura, em que tempos de retenção são normalmente entre 9 a 30 dias. Os tempos de retenção indicam o período levado (ou fase de atraso) para o metabolismo da matéria prima de carboidrato e a produção do biogás.

Exemplo 12: Produção de bioetanol

A hidrólise enzimática padrão foi realizada a 37°C, 50°C, e 60°C em 300 mL e contêineres de 1 L com agitação a ~13,6 rad/s. A dosagem de enzima foi de 32 FPU de cada preparação de enzima por grama de celulose em uma solução de substrato em tampão (conforme descrito por Gillera, (NUI, Galway, Tese de Ph.D., 2004) peso total processado = 100 g em estudos em escala de laboratório). O pH do tampão da reação foi ajustado para pH 5,0. Amostras foram removidas a intervalos cronometrados e a ação enzimática foi terminada por fervura por 10 minutos. Por um período de 0-72 horas foi mensurado o seguinte:

- Liberação de açúcares de redução e detecção e quantificação dos açúcares individuais (expressos como g/L)
- Análise de HPLC dos produtos de açúcar da hidrólise (quantidades do produto expressas em g/L)
- Redução no peso/volume do resíduo
- Teor de fibra de celulose antes e após o tratamento enzimático.

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) da integridade do substrato antes e após o tratamento enzimático. A produção de ácidos graxos chave durante o

metabolismo dos açúcares pelas bactérias anaeróbicas, e a produção de metano, foram monitoradas por cromatografia gasosa (GC). O bioetanol produzido por fermentação de levedura foi medido utilizando duas abordagens, um kit de
 5 ensaio ligado a enzima para quantificação do etanol (r-Biopharm, Alemanha) e também por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

O hidrolisado de espruce Sitka, dejetos de papel e resíduos madeirosos (mistura de resíduos de coníferas, essencialmente espruce Sitka) foram testadas em estudos em
 10 escala de laboratório. Dois formatos de produção de etanol foram investigados, SHF (Sequential Hydrolysis and Fermentation - Hidrólise e Fermentação Sequencial) e SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation -
 15 Sacarificação e Fermentação Simultâneas)

Tabela 19

Composição de coquetel de enzimas para produção de bioetanol

Enzima	MGBG1 ^a (%)	MGBG2 ^b (%)	MGBG3 ^c (%)	MGBG4 ^d (%)
CBH1	20-28	15-20	15-17	12-15
CBH2	15-20	20-28	22-26	24-30
β -(1,3)4-glucanase	20-25	20-26	25	20-22
β -glucosidase	10-12	10-11	11-15	~10,0
Xilanoase	20-25	18-30	24-27	20-30
β -Xilosidase	5-10	8-10	10-12	5-8
α -Glucuronidase	5-8	8-10	6-8	8-10
α -L-Arabinofuranosidase	0,5-2,0	0,5-2,0	2-4,0	1,5-3,0
(Outras hidrolases,	8-15	6-17	12-15	10-15

incluindo enzimas Pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterases, protease; atividades de oxidase modificadora de lignina)				
Dados de estudos em escala de laboratório de 1 L em SHF e SSF.				
Valores da hidrólise têm por base a celulose disponível e qualquer hemicelulose residual no substrato.				

Tabela 20

Comparação da produção de bioetanol de hidrolisado de espruce gerado por composições da invenção e por enzimas comerciais

Preparação da enzima	Tempo ótimo de reação (h)	% de hidrólise*	Hexos e g/L	SSF etanol g/L (37°C)	Eficiência da fermentação (37°C)	Temperatura ótima de reação (°C) para SHF	SHF de etanol g/L	Eficiência de fermentação o SHF
Celluclast	48 h	74,5	13,59	4,69	43,44	50,0	6,93	64,21
Cell+Novozym (24:4)	48 h	78,9	19,46	nd	nd	50,0	8,97	83,18
	72 h	82,3	19,50	5,70	52,80	50,0	nd	nd
MGBG1	48 h	57,9	12,56	4,83	44,74	50,0	nd	nd
	72 h	87,2	19,34	nd	nd	50,0	nd	nd
	24 h	88,1	19,14	nd	nd	60,0	10,29	91,50

	24 h	90,4	19,75	6,89	63,82	70,0	10,51	93,46
MGBG2	24 h	89,3	20,84	7,04	65,25	60,0	10,39	92,39
	24 h	91,2	22,32	8,01	74,21	70,0	10,53	93,64
MGBG3	24 h	87,3	15,69	8,58	79,53	70,0	8,71	80,71
MGBF4	24h	92,2	19,76	9,55	88,49	70,0	10,65	98,75
	48 h	89,9	16,14	nd	nd	70,0	nd	nd

Tabela 21

Produção de bioetanol de dejetos de papel e resíduos de madeiras moles geradas pelos coquetéis de enzimas termo-estáveis T. emersonii em comparação com enzimas comerciais (dados de estudos em escala de laboratório de 1 L em SHF e SSF; valores de hidrólise têm por base a celulose disponível e qualquer hemicelulose residual no substrato)

Preparação da enzima	Temperatura ótima de reação (°C)	Tempo ótimo de reação (h)	% de hidrólise*	Hexose g/L	SHF etanol g/L	Eficiência de fermentação SHF	SSF etanol g/L (37°C)	Eficiência de fermentação SSF (37°C)
Dejetos de papel								
MGBG1	70,0	24 h	76,5	13,59	8,36	74,3	7,18	66,5
MGBG3	70,0	24 h	79,2	17,57	7,89	70,2	8,08	74,6
MGBG4	70,0	24 h	83,4	19,46	7,54	69,9	8,22	76,2
Resíduos de madeira mole								
MGBG1	70,0	24 h	63,8	11,21	7,57	67,3	7,03	65,1
MGBG3	70,0	24 h	74,9	13,09	7,92	70,4	7,53	69,8

MGBG4	70,0	24 h	77,9	13,57	7,74	71,8	7,82	72,5
-------	------	------	------	-------	------	------	------	------

Tabela 22

Outros coquetéis para produção de hidrolisados ricos em açúcar fermentável de fluxos de dejetos de verduras/frutas

Coquetel	Composição do coquetel	Aplicação alvo	Substrato	Temperatura ótima de tratamento (°C)	Produtos do açúcar
MGBG 18	CBH 1 (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (25-40%) β -glucosidase (~5%) Xilanoase (18-25%) 1-2,0% β -Xilosidase 1-3,0% Exoxilanoase 8-10% α -Glucuronidase	Produção de açúcares fermentáveis para a produção de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas	dejetos de veg/frutas mistas (restaurante)	>60°C (até 80°C)	Xilose Glicose, Ácido galacturônico, Frutose, Arabinose, Galactose, Ramnose

	1,5-5,0% Arabinofuranosi- dase 10-15% pectinolíticas incluindo galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase 5-7% modificadora amido 5-10% hemicelulases, incluindo galactosidase,	α -L- enzimas β - galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase atividade de outras β -	químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, etc.			
--	--	--	--	--	--	--

	1-4% oxidoreductase/oxidase e esterases 8-12% protease					
MGBG32	CBH I (1-5%) CBH II (1-5%) β (1,3)4-glucanase (20-25%) β -glucosidase (8-12%) Xilanoase (30-35%) 0,5-1,5% β -Xilosidase 1,0-2,5% α -L-Arabinofuranosidase 18-25% enzimas pectinolíticas	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos,	Dejetos de veg/frutas mistas (restaurante); Também frutas moles mistas	>60°C (até 80°C)	Xilose, Glicose, Ácido galacturônico, Frutose, Arabinose, Galactose, Ramnose	

	incluindo β -galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase 5-10% atividade modificadora de amido 8-15% oxidoreductase/oxidase e esterases 10-15% protease	precursores de aroma e sabor, etc. Também pode ser usado para extração de suco aprimorada e produção de 'bebidas da saúde'		
MGBG6 (4% Cenoura/ BP; 1:1)	CBH I (1-5%) CBH II (1-5%) β (1,3)4-glucanase (22-28%) β -glucosidase (10-	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou	Dejetos de veg/frutas mistos (restaurante)	Xilose Glicose, Ácido galacturônico, frutose,

15%) Xilanoase (25-30%) 0,7-2,1% β - Xilosidase 2-4% α -L- Arabinofuranosidase 20-25% enzimas pectinolíticas incluindo β - galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase 5-8% atividade modificadora de amido 12-15%	outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matér ias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, precursores de aroma e sabor, etc. Também pode ser usado para extração de suco aprimorada e produção de 'bebidas da saúde'	Também frutas moles mistas	arabinose, galactose, ramnose
---	---	-------------------------------------	-------------------------------------

	oxidoreductase/oxidase e esterases				
	8-12% protease				

Tabela 23

Coquetéis para a produção de hidrolisados ricos em açúcares fermentáveis de fluxos de dejetos hospitalares ricos em celulose

Coquetel (%)	Composição do coquetel	Aplicação alvo	Substrato	Temperatura ótima de tratamento (°C)	Produtos de açúcar	do
MGBG 1	CBH 1 (20-28%) CBH II (15-20%) β (1,3)4-glucanase (20-25%) β -glucosidase (10-12%) Xilanoase (20-25%) β -Xilosidase (5-10%)	Açúcares fermentáveis para a produção de biocombustível	Fluxo de dejetos hospitalar rico em celulose esterilizada	>65°C (até 85°C)	Xilose Glicose, como os principais açúcares, com alguma galactose	

	α-Glucuronidase (5-8%) α-L-Arabinofuranosidase (0,5-2,0%) Outras (8-15% hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas. ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e protease; atividade de oxidase modificadora de lignina) 5-10% outras hemicelulases, incluindo β-galactosidase,				
--	--	--	--	--	--

	1-4% oxidoreductase/oxidase e esterases 8-12% protease					
MGBG2	CBH 1 (15-20%) CBH II (20-28%) β (1,3)4-glucanase (20-26%) β -glucosidase (10-11%) Xilanoase (18-30%) β -Xilosidase (8-10%) α -L-Arabinofuranosidase (0,5-2,0%) (6-17%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas, ácido	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustív el	Fluxo de dejetos hospitalares ricos em celulose esterilizada	>60°C 85°C)	(até	Xilose e glicose como principais açúcares, com alguma manose e galactose

	fenólico e acetil(xilano) esterases e protease; atividade de oxidase modificadora de lignina)				
MGBG4	CBH I (12-15%) CBH II (24-30%) β (1,3)4-glucanase (20-22%) β -glucosidase (~10%) Xilanoase (20-30%) β -Xilosidase (5-8%) α -Glucuronidase (8-10%) α -L-Arabinofuranosidase (1,5-3,0%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustív el	Fluxo de dejetos hospitalares ricos em celulose esterilizada	(até 60°C 85°C)	Glicose e Xilose como principais açúcares, com alguma manose e galactose

	(10-15%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e Protease; atividades de oxidase modificadora de lignina)				
MGBG 27	CBH 1 (50-55%) CBH II (20-25%) β (1,3)4-glucanase (12-20%) β -glucosidase (5-8%) Xilanoase (~5%) β -Xilosidase (0,1-	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustív	Fluxo de dejetos hospitalares ricos em celulose esterilizada	60°C 85°C)	(até Essencialmente glicose; quantidade secundária de xilose

	0,5%) α -Glucuronidase (8-10%) α -L-Arabinofuranosidase (0,5-2,0%) (5-8%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas selecionadas, esterases; 0,5-1,5% Protease; 0,5-1,5 atividades de oxidase)	el				
MGBG 31	CBH 1 (5-10%) CBH II (~15%) β (1,3)4-glucanase (28-32%) β -glucosidase (8-12%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação	Fluxo de dejetos hospitalares ricos em celulose	60°C 85°C)	(até	Glicose e xilose como os principais açúcares, com alguma manose,

	Xilanoase (22-30%) β -Xilosidase (10-15%) α -Glucuronidase (2-5%) α -L-Arabinofuranosidase (1-3,0%) (20-25%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e Protease; atividades de oxidase modificadora de lignina)	de biocombustív el	esterilizada		galactose e ácido galacturônico
MGBG 34	CBH I (20-25%) CBH II (10-15%)	Produção de açúcares	Fluxo de dejetos	60°C (até 85°C)	Glicose e xilose como os

	β(1,3)4-glucanase (24-28%) β-glucosidase (10-15%) Xilanoase (25-30%) β-Xilosidase (5-8%) α-Glucuronidase (1-3%) α-L-Arabinofuranosidase (2-3,0%) (5-10%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e Protease; atividades de oxidase modificadora de	fermentáveis para a fabricação de biocombustív el	hospitales ricos em celulose esterilizada	principais açúcares, com alguma manose, galactose e ácido galacturônico
--	--	--	--	--

	lignina)		Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustív el	Fluxo dejetos hospitalares ricos em celulose esterilizada	60°C 85°C)	(até	
MGBG 35	CBH I (10-12%) CBH II (~15%) β(1,3)4-glucanase (30-40%) β-glucosidase (5-10%) Xilanoase (15-28%) β-Xilosidase (2-5%) α-Glucuronidase (1-3%) α-L-Arabinofuranosidase (1-3,0%) (~15%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase						Glicose e xilose como principais açúcares, com alguma manose, galactose e ácido galacturônico

	s e Protease; enzimas modificadoras de amido, atividades de oxidase modificadora de lignina)				
MGBG 35	CBH I (10-12%) CBH II (~15%) β (1,3)4-glucanase (30-40%) β -glucosidase (5-10%) Xilanoase (15-28%) β -Xilosidase (2-5%) α -Glucuronidase (1-3%) α -L-Arabinofuranosidase (1-3,0%) (~15%: outras hidrolases, incluindo	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustív el	Fluxo de dejetos hospitalares ricos em celulose esterilizada	60°C 85°C)	(até Glicose e xilose como os principais açúcares, com alguma manose, galactose e ácido galacturônico

	enzimas pectinolíticas como β -galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, enzimas degradadoras de manan como α -galactosidase, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e Protease; atividades modificadoras de amido, atividades de oxidase modificadora de lignina)					
MGBG 37	CBH 1 (15-20%) CBH II (35-40%)	Produção de açúcares	Fluxo de dejetos	60°C 85°C)	(até	Glicose e xilose como os

	β(1,3)4-glucanase (20-25%) β-glucosidase (5-10%) Xilanoase (15-20%) β-Xilosidase (1-3%) α-Glucuronidase (0,5-2%) α-L-Arabinofuranosidase (1-3,0%) (12-15%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas como β-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, enzimas degradadoras	fermentáveis para a fabricação de biocombustív	hospitales ricos em celulose esterilizada	principais açúcares, com alguma manose, galactose e ácido galacturônico
--	--	---	--	--

	de manan como α -galactosidase, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e Protease; atividade modificadora de amido, atividades de oxidase de modificadoras de lignina)				
MGBG 38	CBH I (25-30%) CBH II (15-20%) β (1,3)4-glucanase (15-20%) β -glucosidase (2-8%) Xilanoase (25-30%) β -Xilosidase (1-3%) α -Glucuronidase (0,5-	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustív el e outros	Têxteis ricos em algodão, especialmente em formas altamente purificadas do algodão	60°C (até 85°C)	Glicose, alguma manose, galactose e ácido galacturônico. Quantidades secundárias de xilose

	2%) α-L- Arabinofuranosidase (1-3,0%) (15-20%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas como β-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, enzimas degradadoras de manan como α- galactosidase, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e Protease; atividade modificadora	produtos de alto valor, incluindo antibióticos , carotenóides , compostos de sabores e aroma de alimentos, matéria prima química, etc.		
--	---	---	--	--

	de amido, atividades de oxidase de modificadoras de lignina)					
MGBG 39	CBH 1 (20-25%) CBH II (20-25%) β (1,3)4-glucanase (20-25%) β -glucosidase (8-12%) Xilanoase (20-25%) β -Xilosidase (2-5%) α -Glucuronidase (1-3%) α -L-Arabinofuranosidase (1-3,0%) (8-12%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustív el e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos , carotenóides	Texteis ricos em algodão, incluindo fibras mais mistas	60°C (até 85°C)	Essencialmente glicose, com alguma xilose, galactose e ácido galacturônico	

	como β-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, enzimas degradadoras de manan como α-galactosidase, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e Protease; atividade modificadora de amido, atividades de oxidase modificadoras de lignina)	, compostos de sabores e odores de alimentos, matéria prima química, etc.			
MGBG 40	CBH 1 (18-25%) CBH II (15-20%) β(1,3)4-glucanase (25-	Produção de açúcares fermentáveis	Fluxo de dejetos hospitalares	60°C (até 85°C)	Glicose e xilose como os açúcares principais, com

	30%) β-glucosidase (5-10%) Xilanoase (20-25%) β-Xilosidase (0,5-2%) α-Glucuronidase (0,5-2%) α-L-Arabinofuranosidase (1,5-4,0%) (20-25%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas como β-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, enzimas degradadoras de manan como α-	para a fabricação de biocombustív	ricos em celulose esterilizada		alguma manose e galactose
--	---	-----------------------------------	--------------------------------	--	---------------------------

	galactosidase, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e Protease; atividade modificadora de amido, atividades de oxidase de modificadoras de lignina)				
MGBG 43	CBH 1 (10-15%) CBH II (20-25%) β(1,3)4-glucanase (25-30%) β-glucosidase (5-10%) Xilanoase (25-30%) β-Xilosidase (5-10%) α-Glucuronidase (1-3%) α-L-	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustív el	Fluxo de dejetos hospitalares ricos em celulose esterilizada	60°C (até 85°C)	Glicose, e xilose como principais açúcares, com alguma manose

	Arabinofuranosidase (1-3, 0%) (10-14%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e Protease; enzimas modificadoras de amido, atividades de oxidase modificadoras de lignina)				
--	--	--	--	--	--

Tabela 24

Coquetéis para a produção de hidrolisados ricos em açúcar fermentável de fluxos de dejetos têxteis

Coquetel	Composição	do	Aplicação alvo	Substrato	Temperatura	Produtos do
----------	------------	----	----------------	-----------	-------------	-------------

	coquetel (%)			ótima de tratamento (°C)	açúcar
MGBG 34	CBH 1 (20-25%) CBH II (10-15%) $\beta(1,3)4$-glucanase (24-28%) β-glucosidase (10-15%) Xilanoase (25-30%) β-Xilosidase (5-8%) α-Glucuronidase (1-3%) α-L-Arabinofuranosidase (2-3,0%) (5-10% Outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterases	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, compostos de sabores e aroma de alimentos, matéria prima química, etc.	Produtos têxteis ricos em algodão	>60°C (até 85°C)	Essencialmente a glicose, com alguma xilose, galactose e ácido galacturônico

	e protease; enzimas modificadoras de amido, atividade de oxidase modificadora de lignina)					
MGBG37	CBH 1 (15-20%) CBH II (35-40%) β (1,3)4-glucanase (20-25%) β -glucosidase (5-10%) Xilanoase (15-20%) β -Xilosidase (1-3%) α -Glucuronidase (0,5-2%) α -L-Arabinofuranosidase (1-3,0%) (12-15%: outras hidrolases, incluindo	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, compostos de sabor e aroma de alimentos,	Produtos têxteis ricos em algodão, incluindo fibras mais mistas e produtos têxteis de algodão mais	60°C (até 85°C)	(até	Essencialmente a glicose, algumas quantidades menores de xilose e manose

	enzimas pectinolíticas como β -galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, enzimas degradadoras de manan como α -galactosidase, ácido fenólico e acetil(xilano)esterases e Protease; atividade modificadora de amido, atividades de oxidase modificadoras de lignina)	matéria prima química, etc.	processados		
MGBG 38	CBH 1 (25-30%) CBH II (15-20%) β (1,3)4-glucanase (15-20%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de	Produtos têxteis ricos em algodão,	60°C (até 85°C)	Glicose, alguma manose, galactose e

	β-glucosidase (2-8%) Xilanoase (25-30%) β-Xilosidase (1-3%) α-Glucuronidase (0,5-2%) α-L-Arabinofuranosidase (1-3,0%) (15-20%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas como β-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, enzimas degradadoras de manan como α-galactosidase, ácido fenólico e acetil(xilano)esterases	biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, compostos de sabores e aroma de alimentos, matéria prima química, etc.	especialmente em formas altamente purificadas do algodão	ácido galacturônico. Quantidades secundárias de xilose
--	--	---	---	--

	e Protease; atividade modificadora de amido, atividades de oxidase modificadoras de lignina)					
MGBG 39	CBH 1 (20-25%) CBH II (20-25%) $\beta(1,3)4$-glucanase (20-25%) β-glucosidase (8-12%) Xilanoase (20-25%) β-Xilosidase (2-5%) α-Glucuronidase (1-3%) α-L-Arabinofuranosidase (1-3,0%) (8-12%: outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, compostos de sabores e aroma de alimentos,	Produtos têxteis ricos em algodão, incluindo fibras mais mistas	65°C (até 85°C)	Essencialmente glicose, com alguma xilose e manose	

	como β -galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, enzimas degradadoras de manan como α -galactosidase, ácido fenólico e acetil(xilano)esterases e Protease; atividade modificadora de amido, atividades de oxidase modificadoras de lignina)	matéria prima química, etc.			
--	--	-----------------------------	--	--	--

Tabela 25

Coquetéis para a produção de hidrolisados ricos em açúcares fermentáveis de cereais, incluindo colheitas inteiras, grãos, resíduos de processamento e dejetos de cervejaria

Coquetel	Composição do coquetel	Aplicação alvo	Substrato	Temperatura	Produtos do
----------	------------------------	----------------	-----------	-------------	-------------

					ótima de tratamento (°C)	açúcar
MGBG 5	CBH 1 (5-10%) CBH II (8-15%) β(1,3)4-glucanase (18-22%) β-glucosidase (6-10%) Xilanoase (30-35%) β-Xilosidase (5-12%) α-Glucuronidase (1,5-5%) α-L-Arabinofuranosidase (2-3,0%) (5-10% hidrolases, incluindo enzimas	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, como matérias primas químicas/bioquímicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes	de Cereais, incluindo colheitas inteiras, grãos, resíduos de processamento e de cervejaria especialmente	>60°C (até 85°C)	Xilose, arabinose, glicose, celobiose, xilobiose, galactose, ácido glicurônico, alguns ácidos fenólicos, pequenas quantidades de ácidos glicurônico	

	pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase e protease; enzimas modificadoras de amido, atividade de oxidase modificadora de lignina)	naturais, etc	cevada, trigo, centeio, milho, resíduos de malte processado (incluindo o grãos de destilaria as)		s, ácidos galacturônicos e ramnose e oligossacarídeos maiores.
MGBG6	CBH 1 (1-5%) CBH II (1-5%) β (1,3)4-glucanase (22-28%) β -glucosidase (10-15%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível	Cereais, incluindo colheitas inteiras, grãos,	60°C (até 85°C)	Xilose, arabinose, glicose essencialmente

	Xilanoase (25-30%) β-Xilosidase (0,7-2,1%) α-L-Arabinofuranosidase (2-4%) enzimas pectinolíticas (20-25%) como β-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase e galactanase, atividade modificadora de amido (5-8%), oxidoreductase/oxidase e esterases (12-15%) e protease (8-12%)	e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, precursores de sabor e aroma de alimentos, adoçantes naturais, etc.	resíduos de processamento e dejetos de cervejaria - especialmente cevada, trigo e aveia	pequenas quantidades de ácidos glucurônicos, galactose, ácido galacturônico e ramnose e dissacarídeos (celobiose e xilobiose)
--	--	--	--	--

MGBG 7	CBH 1 (5-10%) CBH II (8-12%) β (1,3)4-glucanase (25-30%) β -glucosidase (5-10%) Xilanoase (40-45%) β -Xilosidase (0,5-2%) α -Glucuronidase (2-5,0%) α -L-Arabinofuranosidase (0,5-2,0%) enzimas pectinolíticas (8-15%) essencialmente β -galactosidase e exogalacturonase, esterases (2-4%) e Protease (10-15%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, etc.	Resíduos de cevada, milho, trigo, aveia	>60°C (até 85°C)	Principalmente xilose, arabinose, glicose, celobiose, xilobiose, ácido glucurônico, alguma galactose, ácido fenólico, ácido galacturônico
--------	---	--	---	------------------	---

MGBG 8	CBH 1 (5-10%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, etc.	Cereais, incluindo colheitas inteiras, grãos, resíduos de processamento e dejetos de cervejaria - especialmente trigo, aveia, cevada,	60°C (até 80°C)	Xilose, arabinose, glicose, celobiose, xilobiose; quantidades menores de ácido glucurônico, ácidos fenólicos, e galactose
	CBH II (5-10%) β(1,3)4-glucanase (~20%) β-glucosidase (4-8%) Xilanoase (25-30%), incluindo exoxilanoase (5-10%) β-Xilosidase (1-2%) α-Glucuronidase (5-8%) α-L-Arabinofuranosidase (0,5-3,0%) (8-12%) enzimas pectinolíticas que incluem β-galactosidase, ramnogalacturonase,				

	poligalacturonase, exo-galacturonase, e galactanase, atividade modificadora de amido (8-12%) outras hemicelulases (5-10%) incluindo α-galactosidase, oxidoreductase/oxidase e esterases (1-3%) e protease (10-12%)		malte/resíduos de malte (incluindo o grãos de destilarias)		
MGBG 9	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) $\beta(1,3)4$-glucanase (20-25% incluindo alta lichenanase) β-glucosidase (8-10%) Xilanoase (25-30%),	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto	Cereais, incluindo colheitas inteiras, grãos, resíduos de	>60°C (até 80°C)	Xilose, arabinose, glicose, celobiose, xilobiose; quantidades menores de

	incluindo exoxilanoase (8-12%) β-Xilosidase (2-5%) α-Glucuronidase (1-4%) α-L-Arabinofuranosidase (2-5,0%) (5-10%) enzimas pectinolíticas que inclui α-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, e galactanase, atividade modificadora de amido (2-5%) outras hemicelulases	valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, etc.	processamento e dejetos de cervejaria - especialmente trigo, aveia, cevada, milho, malte de centeio/r esíduos de malte moído (incluindo	ácido glucurônico, ácidos fenólicos, e galactose.
--	---	--	--	--

	(2-5%) incluindo β -galactosidase, oxidoreductase/oxidase e esterases (1-3%) e protease (3-6%)		o grãos de destilarias de destilarias)		
MGBG 10	CBH I (3-6%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (25-40% incluindo alta lichenanase) β -glucosidase (2-5%) Xilanoase (~25-30%), incluindo exoxilanoase (10-15%) β -Xilosidase (5-12%) α -Glucuronidase (2-5%) α -L-	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas,	Cereais, incluindo colheitas inteiras, grãos, resíduos de processamento e dejetos de cervejaria	60°C (até 80°C)	Xilose, arabinose, glicose, celobiose, xilobiose; quantidades menores de ácido glucurônico, ácidos fenólicos, e

	Arabinofuranosidase (2-5, 0%) (5-8%) enzimas pectinolíticas que inclui β- galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, e galactanase, atividade modificadora de amido (5-10%) outras hemicelulases (3-6%) incluindo β- galactosidase, oxidoreductase/oxidase e esterases (2-4%) e protease (5-10%)	carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, etc.	a - especialm ente trigo, aveia, cevada, sorgo e resíduos adjuntos mais novéis, malte/res íduos de malte (incluind o grãos de destilari	galactose. Alguns oligossacar ídeos mais altos.
--	--	--	--	--

			Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, etc.	as)	>60°C (até 80°C)	
MGBG 11	CBH 1 (1-5%) CBH II (5-8%) β (1,3)4-glucanase (20-25% incluindo alta atividade contra glucans de enlace-misto DP alto e médio) β -glucosidase (20-30%) Xilanoase (~15-20%), incluindo exoxilanoase (~3-6%) β -Xilosidase (2-6%) α -Glucuronidase (1-3%) α -L-Arabinofuranosidase (1-3,0%) (8-12%) enzimas			Cereais, incluindo colheitas inteiras, grãos, resíduos de processamento e dejetos de cervejaria - especialmente trigo, aveia,		Xilose, arabinose, glicose, quantidades menores de ácido glucurônico, ácidos fenólicos, galactose, e ramnose. Alguns oligosacáridos mais altos.

	pectinolíticas que inclui β -galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, e galactanase, atividade modificadora de amido (5-10%) outras hemicelulases (6-11%) incluindo α -galactosidase, oxidoreductase/oxidase e esterases (3-7%) e protease (10-15%)		cevada, milho, malte de centeio/r esíduos de malte moído (incluindo o grãos de destilaria as)		
MGBG 13	CBH 1 (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (25-	Produção de açúcares fermentáveis para	Cereais, incluindo colheitas	>60°C (até 80°C)	Xilose, arabinose, glicose,

40%	β-glucosidase (~5%) Xilanoase (18-25%), β-Xilosidase (1-2%) Exoxilanoase (1-3%) α-Glucuronidase (8-10%) α-L-Arabinofuranosidase (1,5-5,0%) (10-15%) enzimas pectinolíticas que incluem β-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, e galactanase,	a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, etc.	inteiras, grãos, resíduos de processamento e dejetos de cervejaria - especialmente aveia, cevada, trigo, malte/resíduos de malte	celobiose, xilobiose, galactose, ácido glucurônico, alguns ácidos fenólicos, ácido galacturônico e ramnose
-----	--	--	---	---

	atividade modificadora de amido (5-7%) outras hemicelulases (5-10%) incluindo α -galactosidase, oxidoreductase/oxidase e esterases (1-4%) e protease (8-12%)		(incluindo o grãos de destilaria)		
--	--	--	-----------------------------------	--	--

Tabela 26

Coquetéis para a produção de hidrolisados ricos em açúcares fermentáveis de resíduos hortícolas com base em não-cereais, incluindo gramíneas (e silagem), folhas, podados de podas e

5 fluxos de resíduos de floristas

Coquetel	Composição do coquetel (%)	Aplicação alvo	Substrato	Temperatura ótima de tratamento (°C)	Produtos do açúcar
MGBG 2	CBH 1 (15-20%)	Produção de	Resíduos	>60°C (até	Glicose,

	CBH II (20-28%)	açúcares	horticult	85°C)	xilose como
	β (1,3)4-glucanase (20-26%)	fermentáveis para a fabricação de biocombustível	urais, incluindo gramas, folhas, restos de poda e fluxos de		principais açúcares, com alguma arabinose, manose e galactose, ácidos
	β -glucosidase (10-11%)	e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/mat	dejetos		glicurônico
	Xilanoase (18-30%)	érias primas	de		s e
	β -Xilosidase (8-10%)	químicas,	floristas		galacturôni
	α -L-Arabinofuranosidase (0,5-2,0%)	carotenóides,	mistos;		cos, alguns
	(6-17% Outras hidrolases, incluindo enzimas	antibióticos, probióticos,	especialm		ácidos
	pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase	adoçantes naturais, moléculas	ente bom para mais materiais madeirosos		fenólicos, e ramnose, assim como alguns
	s e protease;	antioxidantes,	s		oligossacar

	atividade de oxidação modificadora de lignina)	etc.			ídeos DP maiores.
MGBG13	CBH 1 (5-10%) CBH II (5-10%) $\beta(1,3)4$-glucanase (25-40%) β-glucosidase (~5%) Xilanoase (18-25%) β-Xilosidase (1-2,0%) Exoxilanoase (1-3,0%) α-L-Arabinofuranosidase (1,5-5%) enzimas pectinolíticas (10-15%), incluindo α-galactosidase, ramnogalacturonase,	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos,	Dejetos hortícolas, incluindo gramas, folhas, restos de poda e fluxo de dejetos de floristas misto; também bom para	60°C (até 80°C)	Xilose, arabinose, glicose, celobiose, galactose, manose, ácido galacturônico, alguns ácidos fenólicos, ácidos galacturônicos e ramnose.

	poligalacturonase, exo-galacturonase e galactanase, atividade modificadora de amido (5-7%), outras hemicelulases (5-10%), outras hemicelulases, incluindo α-galactosidase, oxidoreductase/oxidase e esterases (1-4%) e protease (8-12%)	adoçantes naturais, moléculas antioxidantes etc.	a casca	Alguns oligossacarídeos maiores
--	--	---	----------------	--

MGBG 21	CBH 1 (5-10%) CBH II (5-10%) β(1,3)4-glucanase (15%) β-glucosidase (~2-10%) Xilanoase (50-55%)+[Xilosidase- 1-5%, Exoxilanase 5-10%, α-glicurinodease 1-4%, α-L-arabinofuranosidase 2-5%, enzimas pectinolíticas 20-25%, atividade modificadora de amido 5-7%, outras hemilcelulases 5-10%, incluindo galactosidase, oxidoreductase/oxidase e	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, etc.	Dejetos horticulturais, incluindo gramas, folhas, restos de poda e fluxo de dejetos de floristas misto; também bom para	>60°C (até 80°C)	Xilose, arabinose, glicose, galactose, ácido glucurônico, manose, ácido galacturônico, alguma frutose, ramnose, alguns ácidos fenólicos e sucrose, alguns oligossacar
---------	--	---	--	----------------------------	--

	esterases 2-4% protease ~10%	+				ídeos maiores.
--	---------------------------------	---	--	--	--	-------------------

MGBG 32	CBH 1 (1-5%) CBH II (1-5%) β(1,3)4-glucanase (20-25%) β-glucosidase (~8-12%) Xilanoase (30-35%)+ [β-Xilosidase (0.5-1.5%), α-L- Arabinofuranosidase (1,0-2,5%), enzimas pectinolíticas 18-25% que incluem alfa-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, e galactanase,	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, etc.	Dejetos horticulturais, incluindo gramas, folhas, restos de poda e fluxo de dejetos de floristas misto	>60°C (até 80°C)	Xilose, glicose, arabinose, celobiose, galactose, ácido galacturônico, alguma frutose, ramnose e alguns ácidos fenólicos.
---------	--	---	---	----------------------------	--

	atividade modificadora de amido (5-10%), oxidoreductase/oxidase e esterases + protease (10-15%)				
MGBG 34	CBH 1 (20-25%) CBH II (10-15%) β (1,3)4-glucanase (24-28%) β -glucosidase (10-15%) Xilanoase (25-30%) β -Xilosidase (5-8%) α -Glucuronidase (1-3%) α -L-Arabinofuranosidase (2-3,0%) Outras hidrolases (5-10%) incluindo enzimas	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, precursores de aroma e de sabor, matéria prima	Dejetos horticulturais, incluindo gramas, folhas, restos de poda e fluxo de dejetos de floristas misto	60°C (até 85°C)	Glicose, arabinose, xilose principalmente com alguma galactose e ácido galacturônico; ácidos fenólicos, ramnose, e alguns

	pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e protease; enzimas modificadora de amido; atividades de oxidase modificadoras de lignina)	química, etc.			oligossacarídeos

Tabela 27

Coquetéis para a produção de hidrolisados ricos em açúcar fermentáveis de fluxos de dejetos de papel

Os dejetos de papel incluem: jornal em preto e branco, jornal colorido, revistas brilhantes, 5 copos de papel, pratos de papel, lenços/lenços descartáveis, papel de embrulho, papelão corrugado, papel branco de escritório, celofane, toalha de cozinha, Kleenex™ e bandagens de algodão domiciliar.

Coquetel	Composição do coquetel (%)	Aplicação alvo	Substrato	Temp de tratamento	Produtos do açúcar
----------	----------------------------	----------------	-----------	--------------------	--------------------

					(°C)	
MGBG 26	CBH 1 (5-10%)	Produção de açúcares	Copos de papel,	60°C	(até 85°C)	Glicose, arabinose e xilose, alguma galactose e ácido galacturônico; alguns oligosacarídeos
	CBH II (45-50%)	fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, sabores para alimentos e compostos de aroma, matérias primas de produtos químicos, etc.	de papel de embrulho, Kleenex™ e produtos de papel de relação dos			
	β (1,3)4-glucanase (10-15%)					
	β -glucosidase (0,5-2,0%)					
	Xilanoase (15-20%)					
	β -Xilosidase (0,2-1,0%)					
	α -Glucuronidase (0,5-2,0%)					
	α -L-Arabinofuranosidase (0,5-1,5%)					
	Outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas (3-6%),					

	ácido fenólico (0,2-1,0%) e acetil(xilano)esterase s (1-5%) de protease; enzimas modificadoras de amido (5-10%), atividades de oxidoreductase/oxidase (2-5%)				
MGBG27	CBH I (50-55%) CBH II (20-25%) β (1,3)4-glucanase (12-20%) β -glucosidase (5-8%) Xilanoase (~5%) β -Xilosidase (0,1-0,5%) α -L-	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos,	Papel de escritório o branco, pratos de papel e produtos relaciona dos	60°C (até 85°C)	Glicose, quantidade es menores de arabinose e xilose, galactose e ácido

	Arabinofuranosidase (0,5-2,0%) (5-8%): Outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas esterases selecionados (0,5-1,5%); protease (0,5-1,5%); atividades de oxidase (0,5-1,5)	carotenóides, sabores para alimentos e compostos de aroma, matérias primas para produtos químicos, etc.		galacturô nico; alguns oligosaca rídeos, mas essencial mente monossaca rídeos
MGBG 28	CBH 1 (10-15%) CBH II (30-35%) β (1,3)4-glucanase (15- 20%) β -glucosidase (2-5%) Xilanoase (20-25%) β -Xilosidase (0,5- 2,0%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo	Papel de escritório o branco, pratos de papel e produtos relaciona dos	Glicose, quantidade es menores de arabinose , xilose galactose

	α-L-Arabinofuranosidase (0,5-2,0%) Outras hidrolases incluindo enzimas pectinolíticas e modificadoras de amido selecionadas, esterases (2-5%); protease (8-10%), atividades de oxidase (2-5%)	antibióticos, carotenóides, compostos de aroma e de sabor, matéria prima de produtos químicos, etc.			e ácido galacturônico; alguns oligosacários, mas essencialmente monossacários
MGBG 29	CBH I (8-10%) CBH II (8-10%) β(1,3)4-glucanase (20-30%) β-glucosidase (25-30%) Xilanoase (20-30%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos	Lenços de uso médico, bandagens de algodão,	60°C (até 85°C)	Glicose, quantidade es menores de arabinose

	β-Xilosidase (0,5-2,0%) α-L-Arabinofuranosidase (0,5-2,0%) Hidrolases incluindo enzimas pectinolíticas (5-10) e modificadoras de amido (5-8) selecionadas, esterases (1-3%); protease (5-10%), oxidases (2-5%)	de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, compostos de aroma e de sabor, matéria prima de produtos químicos, etc.	papelão e celofane	, xilose galactose e ácido galacturônico; alguns oligosacarídeos, mas essencialmente monossacarídeos
--	---	---	---------------------------	---

Tabela 28

Coquetéis para a produção de hidrolisados ricos em açúcar fermentáveis de dejetos/resíduos de embalagens biodegradáveis

Coquetel	Composição do coquetel	Aplicação alvo	Substrato	Temp ótima	Produtos
----------	------------------------	----------------	-----------	------------	----------

	(%)			de tratamento (°C)	do açúcar
MGBG 30	CBH 1 (20-25%) CBH II (20-25%) β (1,3)4-glucanase (15-20%) β -glucosidase (1-5%) Xilanoase (25-30%) β -Xilosidase (5-10%) α -L-Arabinofuranosidase (0,6-2,0%) Outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas selecionadas (8-12%), enzimas modificadoras	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, sabores para alimentos e compostos de aroma, matérias primas de	Dejetos/r esíduos de embalagen s biodegrad áveis	60°C 85°C	Xilose, glicose, galactose , pequenas quantidade es de manose, ácido galacturô nico; e alguns oligosaca rídeos, mas

	de amido (4-8%), enzimas degradadoras de manan (1-3%), esterases (1-5%); protease (3-6%); atividades de oxidase (2-5%)	produtos químicos, etc.			essencial mente monossacarídeos
MGBG35	CBH I (10-12%) CBH II (~15%) β (1,3)4-glucanase (30-40%) β -glucosidase (5-10%) Xilanoase (15-28%) β -Xilosidase (2-5%) α -Glucuronidase (1-3%) α -L-Arabinofuranosidase (1-3,0%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, sabores para	Dejetos/resíduos de embalagem e biodegradáveis	60°C (até 85°C)	Glicose e xilose como os principais açúcares, com alguma manose, galactose e ácido

	(~15%: Outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas como α -galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, enzimas degradadoras de manan como β -galactosidase, ácido fenólico e acetil(xilano)esterase s e protease; enzimas modificadoras de amido, atividades de oxidase modificadoras de lignina)	alimentos compostos de aroma, matérias primas para produtos químicos, etc.			galacturônico
MGBG 29	CBH 1 (8-10%)	Produção	de	Dejetos/r	60°C (até Glicose,

	CBH II (8-10%)	açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e outros produtos de alto valor, incluindo antibióticos, carotenóides, compostos de aroma e de sabor para alimentos, matéria prima de produtos químicos, etc.	esíduos de embalagens biodegradáveis	85°C)	quantidade menores de arabinose, xilose galactose e ácido galacturônico; essencialmente monossacarídeos
	β(1,3)4-glucanase (20-30%) β-glucosidase (25-30%) Xilanoase (20-30%) β-Xilosidase (0,5-2,0%) α-L-Arabinofuranosidase (0,5-2,0%) Hidrolases incluindo enzimas pectinolíticas (5-10%) e modificadoras de amido (5-8%) selecionadas, esterases (1-3%); protease (5-10%), atividades de oxidase				

	(2-5%)					
--	--------	--	--	--	--	--

Tabela 29

Coquetéis para a produção de hidrolisados ricos em açúcares fermentáveis de biomassa fungal (incluindo biomassa gasta de pós-fermentação) e biomassa de algas marinhas

Coquetel	Composição do coquetel (%)	Aplicação alvo	Substrato	Temp p/tratamento (°C)	Produtos de açúcares
MGBG 9	CBH 1 (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (20-25% incluindo alta liquenase) β -glucosidase (8-10%) Xilanoase (25-30%), incluindo exoxilanoase (8-12%) β -Xilosidase (2-5%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/mat	Levedo e biomassa de fungos filamentosos	>60°C (até 80°C)	Glicose, celobiose, manose, galactose, alguns oligosacarídeos essenciais

	α-Glucuronidase (1-4%) α-L-Arabinofuranosidase (2-5, 0%) (5-10%) enzimas pectinolíticas que incluem β-galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, e exo-galacturonase, galactanase, atividade modificadora de amido (5-10%) outras hemicelulases (3-6%) incluindo α-galactosidase, oxidoreductase/oxidase	érias químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, etc.			
--	---	--	--	--	--

	e esterases (2-4%) e protease (5-10%)				
MGBG 13	CBH 1 (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (25-40%) β -glucosidase (~5%) Xilanoase (18-25%), incluindo β -Xilosidase (1-2%) exoxilanoase (1-3%) α -Glucuronidase (8-10%) α -L-Arabinofuranosidase (1,5-5,0%) (10-15%) pectinolíticas que	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes	Levedo e biomassa de fungos filamentosos	>60°C (até 80°C)	Glicose, celobiose, manose, galactose, alguns oligosacarídeos essenciaismente

	incluem β -galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exo-galacturonase, e galactanase, atividade modificadora de amido (5-7%) outras hemicelulases (5-10%) incluindo α -galactosidase, oxidoreductase/oxidase e esterases (1-4%) e protease (8-12%)	naturais, etc.			
MGBG 44	CBH 1 (2-5%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (20-25% , (1,3)6-	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de	Levedo e biomassa de fungos filamentosos	>60°C (até 80°C)	Glicose, celobiose, manose, galactose

	glucanase (20-25%), N-acetilglucoaminidase e/ou quitinase beta-glucosidase (5-10%), Xilanoase (10-15%), incluindo [β-Xilosidase (5-10%) α-Glucuronidase (1-5%) α-L-Arabinofuranosidase (1-5,0%) (10-15%) enzimas pectinolíticas (5-10%) que incluem alfa-galactosidase e galactanase, atividade modificadora de amido (12-15%)	biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/materiais primários químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais e etc	os		, alguns oligossacarídeos essenciais mente
--	--	---	----	--	--

	outras hemicelulases (2-5%) incluindo manase oxidoreductase/oxidase (2-5%) e esterases (2-4%) e protease (10-15%)				
MGBG 45	CBH 1 (5-10%) CBH II (5-10%) β(1,3)4-glucanase (15-20% , (1,3)6-glucanase(25-30%), N-acetilglucoaminidase e/ou quitinase beta-glucosidase(5-10%), xilanoase (1-4%), incluindo [β-Xilosidase (2-5%)	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes	Levedo e biomassa de fungos filamentosos ou biomassas algais e resíduos processados	>60°C (até 80°C)	Glicose, celobiose, manose, galactose, alguns oligosacarídeos essenciais

	enzimas pectinolíticas (5-10%) que incluem beta-galactosidase e galactanase, atividade modificadora de amido (12-15%) outras hemicelulases (2-5%) incluindo manase oxidoreductase/oxidase (2-5%) e esterases (2-4%) e protease (10-15%)	naturais e etc			
MGBG 48	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) $\beta(1,3)4$ -glucanase (40-45%) , (1,3)6-glucanase(10-15%),	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível	de Levedo e biomassa de fungos filamentosos	>60°C (até 80°C)	Glicose, celobiose, manose, galactose, e

	beta-glucosidase (3-5%), Xilanoase (10-15%), incluindo [β-Xilosidase (5-8%), alfa-glicuronidase (0,5-1,5%), alfa-L-Arabinofuranosidase (0,2-1,5%), enzimas pectinolíticas (2-5%) que incluem beta-galactosidase e galactanase, atividade modificadora de amido (2-5%) outras hemicelulases (4-7%) incluindo manase	e/ou produtos de alto valor, exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, beta-adoçantes naturais e etc		alguns oligosacáridos essencialmente
--	---	---	--	---

	oxidoreductase/oxidase (1-3%) e esterases (1-3%)					
MGBG 49	CBH 1 (0,4-2%) CBH II (0,4-1,0%) β (1,3)4-glucanase (7-15% , (1,3)6-glucanase(12-15%), beta-glucosidase (3-5%), Xilanoase (75-78%), incluindo [β -Xilosidase (0,4-2%), alfa-glicuronidase (0,5-1,5%), alfa-L-	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustíveis e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides,	Levedo e biomassa de fungos filamentosos	>60°C e 80°C	(até	Glicose, celobiose, manose, galactose, e alguns oligosacarídeos essenciaismente

	Arabinofuranosidase (0,2-1,5%), enzimas pectinolíticas (2-5%) que incluem beta-galactosidase e galactanase, atividade modificadora de amido (2-5%) outras hemicelulases (4-7%) incluindo manase oxidoreductase/oxidase (1-3%) e esterases (1-3%)	antibióticos, probióticos, adoçantes naturais e etc			
MGBG 46	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β(1,3)4-glucanase (25-	Produção de açúcares fermentáveis para	de Levedo e biomassa de fungos	>60°C (até 80°C)	Glicose, celobiose, manose,

	30% , beta-glucosidase (5-10%) , Xilanoase (20-25%) , incluindo [β-Xilosidase (2-5%) , alfa-glicuronidase (1-4%) , alfa-L-Arabinofuranosidase (2-5%) , enzimas pectinolíticas (5-8%) que incluem beta-galactosidase e galactanase, atividade modificadora de amido (5-10%) outras hemicelulases (1-2%) incluindo manase	a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais e etc	filamentosos	galactose , alguns oligosacarídeos essenciaismente
--	--	--	---------------------	---

	oxidoreductase/oxidase (2-5%) e esterases (2-5%) + protease (30-35%)					
MGBG 47	CBH I (2-5%) CBH II (2-5%) $\beta(1,3)4$-glucanase (10-15% , (1,3)6-glucanase (40-45%), beta-glucosidase (8-10%), Xilanoase (2-5%), incluindo [β-Xilosidase (1-3%), alfa-glicuronidase (1-2%), alfa-L-Arabinofuranosidase (2-5%), enzimas	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matérias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos,	Levedo e biomassa de fungos filamentosos	>60°C e 80°C	(até	Glicose, celobiose, manose, galactose, e alguns oligossacarídeos essenciais

	pectinolíticas (2-5%) que incluem beta- galactosidases e galactanase, atividade modificadora de amido (2-5%), outras hemilcelulases (~5%) (5-10%) incluindo manase oxidoreductase/oxidas e (2-5%) e esterases (2-5)	adoçantes naturais e etc			
MGBG 6	CBH 1 (1-5%) CBH II (1-5%) β (1,3)4-glucanase (22-28% , beta-	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de	Açúcar de beterraba, incluindo topos,	>60°C (até 80°C)	Xilose, Gl ucose, ácido galacturô

	glucosidase (10-15%), Xilanoase (25-30%), incluindo [β -Xilosidase (0,7- 2,1%), alfa-L- Arabinofuranosidase (2-4%), enzimas pectinolíticas (20- 25%), incluindo beta- galactosidase, ramniogalacturonase, poligalacturonase, exolgalacturonase e galactanase, atividade modificadora de amido (5-8%), oxidoreductase/oxidase	biocombustível e/ou outros produtos de alto valor, por exemplo, (bio)químicos/matér ias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos, adoçantes naturais, precursores de sabor e aroma e etc.	polpa e toda a planta, assim como cana de açúcar e dejetos processados	nico frutose, arabinose , galactose , ramnose, alguns oligosaca rídeos, ácidos fenólicos liberados
--	--	--	---	--

	(12-15%) e esterases + protease 8-12%					
MGBG 20	CBH 1 (5-10%) CBH II (5-10%) β(1,3)4-glucanase (20-32% , beta- glucosidase (~2-10%), Xilanoase (15-25%), incluindo [β-Xilosidase (10- 15%), exoxilanas (10-15%), alfa- glicuronidase (2-5%), alfa-L- Arabinofuranosidase (10-15-5%), enzimas	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de biocombustível e/ou polpa e outros produtos de toda alto valor, por planta, exemplo, (bio)químicos/matér ias primas químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos e etc	Açúcar de beterraba, incluindo topos, e a planta, assim como cana de açúcar e dejetos processados	>60°C (até 80°C)	Xilose, Glucose, ácido galacturônico, frutose, arabinose, galactose, ramnose, alguns oligossacarídeos,	

	pectinolíticas (10-15%), atividade modificadora de amido (~5%), outras hemilcelulases (2-5%) (5-10%), oxidoreductase/oxidase e esterases + protease ~7-10%				ácidos fenólicos liberados
MGBG 18	CBH 1 (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanase (25-40% , beta-glucosidase (~5%), Xilanoase (18-25%), incluindo [β-Xilosidase (1-2%) ,	Produção de açúcares fermentáveis para a fabricação de polpa e outros produtos de alto valor, por exemplo,	Açúcar de beterraba, incluindo	>60°C (até 80°C)	Xilose, Glucose, ácido galacturônico, frutose, arabinose ,

exoxilanas (1-3%), alfa-glicuronidase (8-10%), alfa-L- Arabinofuranosidase (1,5-5%), enzimas pectinolíticas (10- 15%) incluindo beta- galactosidase, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase, atividade modificadora de amido (5-7%), outras hemilcelulases (5- 10%) incluindo alfa- galactosidase,	(bio)químicos/matérias químicas, carotenóides, antibióticos, probióticos e etc	cana de açúcar e dejetos processados	galactose, ramnose, alguns oligosacáridos, ácidos fenólicos liberados
--	--	---	---

	oxidoreductase/oxidase (1-4%) e esterases + protease 8-12%				
--	--	--	--	--	--

Vários dos coquetéis listados acima possuem aplicações em uma ampla gama de outras aplicações. Nessas aplicações, as principais diferenças no uso dos coquetéis situam-se em (a) dosagem da enzima, ou quantidade utilizada em cada tratamento, e (b) a duração da incubação. Por exemplo, MGBG 18 é muito bem adequado no tratamento de certos fluxos de dejetos, bem como em aplicações nutracêuticas. Nas etapas de tratamento de 'dejetos'/sacarificação, uma dosagem mais alta da enzima é utilizada e o tempo de reação é de 18/24 horas (~25-32 unidades de papel de filtragem). A meta final é alcançar uma extensa decomposição do resíduo alvo para monossacarídeos fermentáveis. Em contraste, quando a produção de oligossacarídeos bioativos (quer glucoligossacarídeos e xilooligossacarídeos) é necessária, e/ou uma mudança na textura para pães, uma concentração de enzima mais baixa é necessária e o tempo de modificação (ou de reação) poderá não levar mais do que 1 (máximo 2) horas para alcançar o ponto terminal desejado.

Quando o substrato alvo for essencialmente rico em celulose, as concentrações de enzima têm por base 'unidades de papel de filtragem ou FPU'. Quando um oligossacarídeo bioativo (por exemplo, β -glucoligossacarídeo não-celulósico) estiver sendo produzido, as concentrações de enzima têm por base a atividade principal necessária para fragmentar o substrato alvo (por exemplo, β -1,3; 1,4-glucanos ou β -1,3; 1,6-glucanos de enlace misto de fontes de fundos ou de algas).

Exemplo 13

Produção de enzima por cepas de *T. emersonii* durante fermentação líquida

As cepas de *Talaromyces emersonii* examinadas foram:

IMI (Imperial Mycological Institute (CABI Bioscience))393751 (Patente da cepa), IMI393753 (CBS (Centraal Bureau voor Schimmelcultures)180.68), IMI393759
 5 (CBS 397.64), IMI393760 (CBS472,92), IMI393752 (CBS549.92), IMI393761 (CBS 759.71).

Fermentação líquida: Culturas líquidas replicadas do *T. emersonii* individual foram criadas a 45°C, no meio descrito por Moloney et al., (1983) e Tuohy & Coughlan
 10 (1992), sob condições não controladas de pH. As quatro fontes de carbono selecionadas foram: glicose (monossacarídeo), xilano de trigo de aveia (arabinoglucuronoxilano), pó de alfarrobeira e uma mistura de folhas de chá 1:1/pratos de papel (fragmentado em um
 15 liquidificador por ~15-20 segundos, supernatantes da cultura foram recuperados (Tuohy & Coughlan, 1992; Murray et al., 2002) e utilizados para analisar a produção de enzima extracelular.

Ensaio de enzima: A atividade enzimática foi expressa
 20 em Unidades Enzimáticas Internacionais (IU) por grama de fonte de carbono indutora. Uma unidade de IU libera 1 micromole do produto (açúcar de redução, 4-nitrofenol, etc.) por minuto. Todos os ensaios de exoglicosidase e de endo-hidrolase das enzimas foram conduzidos conforme
 25 descrito anteriormente (Tuohy & Coughlan, 1992; Tuohy et al., 1994, 2002; Murray et al., 2002; Gilleran, 2004). A menos que seja dito de forma diferente, todas as medições de atividade inicial foram conduzidas a 50°C e a pH de 5,0. Atividades de exoglicosidase incluíram: β -Glucosidase, α -
 30 Glucosidase, β -Xilosidase, β -Galactosidase, β -Manosidase,

β -Fucosidase, α -Arabinofuranosidase, N-Acetilglucosaminidase, α -Ranopiranosidase, α -Galactosidase, α -Fucosidase, α -Arabinopiranosidase, α -Manosidase, e a atividade de α -Xilosidase e de α -Glucuronidase foi ensaiada por um método de redução de açúcar utilizando uma mistura de ácidos aldourônicos reduzidos como substrato (Megazyme International Ltd). Este substrato continua ácidos aldotriourônico, aldotetraurônico e aldopentaurônico reduzidos em uma proporção aproximada de 40:40:20. A atividade foi mensurada em pH de 5,0 com um estoque de 5 mg/ml desta mistura. Os grupos de redução liberados durante um período de incubação de 30 minutos foram detectados pelo método DNS. Como algumas das amostras de enzimas continham atividade de β -Xilosidase apreciável que poderia liberar resíduos de xilose dos ácidos Aldourônicos, o ensaio foi repetido e xilose incluída na mistura de reação para inibir a atividade de β -xilosidase.

Enzimas xilanolíticas de exo-atuação adicionais como: α -arabinoxilano arabinofuranohidrolase (liberação de arabinose de arabinoxilan de palha de trigo mensurada utilizando um ensaio ligado à enzima), acetil esterase (utilizando substratos de acetato de 4-nitrofenil e de 4-metilumbeliferil), atividade de acetil xilano esterase (monitorar a liberação de acetato do xilano de madeira de faia acetilatado), esterase de ácido ferúlico (ensaio espectrofotométrico e métodos HPLC) também foram medidos.

Atividades endohidrolase incluídas: Xiloglucanase (xiloglucano de tamarindo), Laminarinase (laminarana de *Laminaria digitata*), endo-1,4- β -glucanase, (referida como CMCase), com base na atividade contra o substrato comercial

de carboximetilcelulose, β -mananase (galactomanana de alfarroba) pectinase e poligalactronase, ramnogalacturonase (ramnogalacturonana de feijão de soja), galactanase (galactanas pécticos de lupin e de batata como substratos),
5 arabinanase (arabinana de beterraba), amilase, glucoamilase, e dextrinase.

Temperatura e pH ótimos e estabilidades: A temperatura ótima para a atividade foi determinada ao realizar os ensaios padrão apropriados a incrementos de temperatura
10 pela faixa de 30-100°C, em tampão de ensaio normal (100 mM NaOAc, 5,0). A variação do pH com a temperatura foi levada em consideração. pH ótimos foram determinados utilizando os seguintes tampões de pH 2,2-7,6: tampão de citrato-fosfato de potência iônica constante do tipo McIlvaine; tampão
15 Tris-HCl de pH 10. Todos os tampões independentemente do pH foram ajustados para a mesma potência iônica com KCl.

Temperatura e estabilidades de pH foram determinadas conforme descritas anteriormente (Tuohy et al., 1993; Gilleran, 2004; Braet, 2005).

20 Determinação de proteína: A concentração de proteínas nas amostras de enzimas (amostras de culturas cruas) foi estimada pela modificação de Bensadoun e Weinstein do método de Lowry (Bensadoun e Weinstein, 1976; Lowry et al., 1951) utilizando a fração BSA V como o padrão (Murray et
25 al., 2001).

Eletroforese e zimografia: Para determinar o perfil de proteínas presentes em filtrados de cultura, um volume conhecido de cada amostra foi concentrado pela liofilização e analisado por Native e/ou renaturação SDS-PAGE ou a
30 focalização isoelétrica (IEF; Tuohy & Coughlan, 1992).

bandas ativas de Endoglicanase nos géis renaturados SDS-PAGE e IEF foram identificados utilizando uma modificação da técnica de sobreposição de gel de MacKenzie & Williams (1984), (Tuohy & Coughlan, 1992). Para detectar a atividade de exoglicosidase, gels foram incubados imediatamente em 50-100 de solução do derivativo apropriado 4-metillumbelliferil glicosídeo (período de reação de 2-30 minutos). Bandas ativas de enzima foram visualizadas sob luz UV utilizando um Fluor-S™ Multimanager (Bio-Rad).

10 **Resultados:**

O cultivo líquido das cepas foi repetido pelo menos 3 vezes, em experimentos independentes conduzidos em períodos de tempo diferentes. Os filtrados de cultura colhidos (120 horas) de frascos replicados (para cada combinação de cepa/fonte de carbono) foram ensaiados quanto à atividade enzimática; múltiplos replicados foram ensaiados a uma faixa de diluições de enzima. Além disso, os resultados foram validados por medições intra- e inter-medições dos ensaios, e independência dos testes de volume. Houve 20 diferenças claras entre as culturas em termos de aparência da cultura e padrão de crescimento. Por exemplo, a cepa IMI393751 produziu rapidamente uma cultura filamentosa bastante densa em glicose, enquanto as várias das outras cepas (por exemplo, CBS180.68, CBS355.92, CBS393.64, 25 CBS395.64, CBS397.64, CBS 549.92 e CBS 759.71) exibiram um crescimento limitado e morfologia atípica, isto é, ausência de crescimento filamentoso normal e formação de uma massa de cultura limitada e de aparência pegajosa. A cepa CBS394.64 produziu uma biomassa de micélios mais baixa, mas 30 cresceu como uma cultura filamentosa, enquanto CBS472.92

adotou morfologia de pelotas sob condições de crescimento idênticas. Um ponto no tempo de crescimento de 120 horas foi selecionado, como estudos anteriores demonstraram que a exoglicosidase extracelular e as atividades endoglicanase
5 estão presentes em quantidades significativas durante o crescimento de *T. emersonii* na maioria das fontes de carbono (em condições não controladas de pH, 'altos e baixos' das atividades chaves foi observado. No entanto, a atividade máxima é geralmente detectada no sentido do fim
10 do ciclo de fermentação).

A utilização da glicose foi de aproximadamente 15-25% por 120 horas para muitas das cepas. A cepa CBS394.64 utilizou ~50-55% enquanto CBS472.92 (que exibiu morfologia de pelota) utilizou ~20-25% da glicose no meio. Em
15 contraste, ~95% da glicose no meio de cultura foi utilizada pela cepa da invenção (IMI393751 por 72 horas e nenhuma glicose foi detectada no meio de cultura no ponto de tempo da colheita de 120 horas.

As Tabelas 31A-D mostram a produção de exoglicosidases
20 selecionadas pelas cepas. Como é revelado pelos resultados, pode-se observar distinções claras entre a cepa da invenção e outras cepas de *T. emersonii* com relação à produção de exoglicosidase.

A glicose não reprime completamente a produção de
25 exoglicosidase pelas cepas de *T. emersonii* (Tabela 31A). A cepa 393751 produz níveis significativamente mais altos de β -glucosidase (Bgase) que as demais cepas e o segundo nível mais alto de N-acetilglucosaminidase (NAGase) durante o crescimento em glicose. O padrão de produção obtido para a
30 cepa 393751 contrasta acentuadamente com aquela para a cepa

CBS549.92 (anteriormente CBS814.70). A produção de vários níveis de atividades de exoglicosidase pela última cepa parece ser reprimida pela glicose. Deve-se observar que os níveis de atividade de exoglicosidase foram medidas em
5 filtrados de cultura não dialisados e dializados no caso de glicose residual no meio estar inibindo a BGase e/ou NAGase presentes (padrões similares foram observados nas amostras dializadas).

A alfarroba induz a produção diferencial de
10 glicosidases extracelulares pelas cepas (Tabela 31B). A cepa CBS 394.64 produz relativamente nenhuma atividade de exoglicosidase além de uma α -arabinofurosidase. Baixos níveis de todas as exoglicosidases foram produzidos pela cepa CBS393.64, CBS495.64 e CBS549.92. A cepa 393751
15 produziu níveis significativos de CE uma ampla gama de exoglicosidades (níveis mais altos de certas atividades, por exemplo, a pectina modificadora de exoglicosidase β -fucosidase).

Produção de Endoglicanase pelas cepas de *T. emersonii*

20 A. Produção de Xilanase: Dois dos principais tipos de atividades de endohidrolase necessários para a conversão de biomassa de planta e de resíduos de dejetos ricos em polissacarídeos não-amido são glucanase e xilanase. De todas as atividades degradadoras de glicano polimérico
25 ensaiadas, a glucanase e a xilanase foram as atividades de glicanase predominantes presentes.

As Tabelas 32A-D apresentam valores para a produção da xilanase por todas as cepas nas mesmas fontes de carbono. Estudos anteriores demonstraram que o tipo selvagem
30 (CBS814.70) e outras cepas mutantes produzem um sistema de

enzima xilanolítico complexo (Tuohy et al., 1993; 1994), com múltiplas endoxilanases. Várias das xilanases isoladas exibem especificidade seletiva no sentido de tipos diferentes de xilanos, por exemplo, arabinoxilanos, 5 arabinoglucuronoxilanos, glucurononxilanos, mais xilanos substituídos verso xilanos não substituídos (de resultados anteriores e os resultados em andamento com as enzimas da cepa da invenção. Como os resultados mostram, a glicose é um forte repressor da expressão de xilanase em todas as 10 cepas de *T. emersonii*. Níveis significativos de atividade de xilanase ativa contra trigo de aveia arabinoxilano de aveia (OSX) é expressa pela cepa 393751. Este componente não é ativo contra arabinoxilanos de centeio ou de trigo.

A alfarroba, que é essencialmente rica em 15 galactômananas (contém algum xilano), é um indutor potente de níveis muito altos de atividade de xilanase contra todos os substratos de xilano pela cepa 393751. O papel da alfarroba como indutor de atividade de xilanase potente não seria esperado com base no conhecimento de sua composição.

20 A aparência das culturas obtidas para um número das cepas CBS (após 120 horas) foi significativamente diferente e diferenças morfológicas claras puderam ser observadas entre as cepas 393751 e a CBS549.92, isto é, crescimento de micélios densos (filamentosos) para a IMI393751 e formação 25 de uma massa de cultura militada e de aparência pegajosa (não filamentosa) para a cepa CBS549.92. Como é mostrado na Tabela 31B, os níveis de xilanase são significativamente mais altos para a cepa 393751 do que qualquer outra. Em contraste com a cepa 393751, a alfarroba é um indutor muito 30 pobre da xilanase nas cepas CBS394.64, CBS395.64, e

CBS549.92. Outra diferença acentuada pode ser observada no tipo de atividade de xilanase induzida pela alfarroba. Na cepa 393751, atividade potente é produzida contra todos os xilanos. Nas demais cepas, em geral, muito pouca ou nenhuma
5 atividade contra arabinoxilanos em centeio e em trigo é produzida. Apenas duas cepas outras além da 393751 produzem níveis apreciáveis de atividade contra ambos desses xilanos, isto é, a CBS472.92 e a CBS759.71. A análise de zimograma do filtrado da cultura da cepa 393751 revelou
10 altos níveis de múltiplas bandas de xilanase ativas, incluindo uma nova xilanase bi-funcional que foi isolada.

A mistura folhas de chá/pratos de papel (TL/PPL) também provaram ser um indutor potente da atividade de xilanase na cepa 393751 (Tabela 32C), e enquanto esta
15 mistura de fato induziu a expressão de xilanase nas outras cepas, os níveis eram significativamente mais baixos. Como foi observado com a alfarroba, foi produzida uma atividade potente pela cepa 393751 contra todos os xilanos, com quase 1,8 vezes maior atividade contra o arabinoxilano de centeio
20 (Rye AX) sendo obtida e atividade mais baixa contra OSX e xilano de madeira de faia. Isto sugere a expressão diferencial de xilanases individuais pela TL/PPL e indutores de alfarroba, que foi suportada subsequente pela análise de zimograma. TL/PPL também induz um sistema
25 de enzima xilanolítico multicomponente e atividade de esterase e oxidase/peroxidase complementares na cepa 303751 e não nas outras cepas. Essas atividades complementares aprimoram a eficácia de hidrolases polissacarídicas nos coquetéis de enzimas otimizados para aplicações de
30 degradação de biomassa chaves (por exemplo, cereais,

dejetos de planta, resíduos madeirosos, produtos de papel). Em comparação com a alfarroba, TL/PPL induz produção de xilanase mais alta por todas as cepas (especialmente a atividade contra as arabinoxilanos), mas níveis são bem mais baixos do que para a cepa 393751. Embora OSX seja um indutor conhecido da xilanase em fungos e de fato induziu a produção de enzimas por todas as cepas, a indução mais acentuada foi com a cepa 393751. No entanto, em contraste com a cepa 393751, apenas OSX induziu alta atividade de xilanase e TL/00L foi um fraco indutor da produção de xilanase pela cepa 472.92. O padrão de produção de enzima na OSX é diferente daquele obtido com a alfarroba e TL/PPL. Em geral, os resultados para a produção de xilanase em OSX sugerem que a cepa 393751 pode metabolizar os substratos grosseiros muito rápida e eficientemente para gerar indutores solúveis de xilanase. A hemicelulose em substratos grosseiros mais complexos é mais acessível a esta cepa. Os resultados também sugerem que os coquetéis de enzimas produzidos pela cepa 393751 nesses substratos complexos seria mais adequada para a hidrólise de materiais e resíduos de planta grosseiros complexos. Estudos modelos e aplicações investigados até agora (por exemplo, conversão de biomassa madeirosa, sacarificação de dejetos vegetais e de alimentos ricos em carboidratos e OFMSW e cereais) confirmaram o potencial desses coquetéis.

Finalmente, as Figuras 32A-D comparam e contrastam a produção de xilanase ativa contra os diferentes substratos de ensaio (isto é, OSX, Rye AX, etc.) pela cepa 393751 e a cepa parente CBS549.92 (também a CBS814.70) em todas as quatro fontes de carbono.

Produção de B. Glucanase e Mananase: Estudos anteriores mostraram que o tipo selvagem (CBS814.70) e outras cepas mutantes produz um sistema de enzima glucanolítico complexo (Murray et al., 2001, 2004; Tuohy et al., 2002; McCarthy et al., 2003, 2005), que inclui celulasas e uma malha de atividades modificadoras de β -glucan não-celulolítica. Como é observado para o sistema xilanolítico, múltiplas endoglucanases são produzidas, dependendo da fonte de carbono. Várias das β -glucanases isoladas exibem especificidade seletiva no sentido de tipos diferentes de β -glucanos.

As Tabelas 7A-D mostram a atividade contra o β -1,4-glucano CMS comercial modificado (Sigma Aldrich), β -1,3;1,4-glucanos de cevada (BBG; Megazyme) e o liquen *Cetraria islandica* (Lichenan; Sigma Aldrich), xiloglucano (coluna dorsal de β -1,4-glucano; Megazyme) de Tamarindo e galactomanana de alfarroba (Megazyme). β -glucanos não-celulósicos estão presentes em concentrações significativas no componente polissacarídeo não-amido de um número de resíduos de plantas, especialmente aqueles derivados de cereais. As Tabelas 7A-D ilustram a indução diferencial das atividades respectivas nas cepas, com o padrão de indução sendo completamente diferente nas fontes de carbono (grosseiro) mais complexo.

A glicose é um potente repressor da produção de glucanase e de mananase em quase todas as cepas (Tabela 33A). Para todas as amostras, as atividades foram mensuradas em amostras dialisadas e não-dializadas. Como revelam os resultados, a alfarroba é um indutor potente de altos níveis de β -1,3;1,4-glucanase (contra BBG e

liquenano) na cepa 393751, os níveis mais altos para todas as cepas testadas (Tabela 33B). Os níveis de β -1,4-glucanase (contra CMC) produzido pela cepa 393751 foram ~10 vezes mais baixos do que a atividade contra BBG (o nível de CMCase foi mais alto para esta cepa quando comparado com outras cepas). A xiloglucanase ainda mais baixa foi detectada, com os níveis obtidos para a cepa 393751 sendo os mais altos. A análise por zimograma confirmou que os tipos de componentes de endoglucanase, padrão de expressão e níveis relativos da expressão dos componentes da glucanase nos respectivos filtrados de culturas de *T. emersonii* são acentuadamente diferentes. Baixos níveis de (galacto)mananase foram produzidos por todas as cepas durante o crescimento em alfarroba.

A mistura TL/PPL foi um indutor ainda mais potente de β -1,3;1,4-glucanase (tanto BBGase como liquenase), e (galacto)mananase, pela cepa 393751 (Tabela 33C). No geral esses resultados destacam a não-equivalência da produção de β -glucanase pelas cepas de *T. emersonii* e confirmam que a cepa 393751 é uma fonte excelente de diferentes atividades de β -glucanase e a mistura TL/PPL induz um coquetel potente dessas atividades.

OSX (Tabela 33D), como esperado, induziu níveis bem mais baixos de β -glucanase do que a alfarroba ou o TL/PPL. O padrão da produção de enzima é diferente para as cepas 393751 e CBS549.92. Na Tabela 33D, níveis de β -1,4-Glucanase (atividade carboximetilcelulase) foram mais baixos para a maioria das cepas exceto a CBS397.64, que produziu níveis duas vezes mais altos do que a cepa 393751 (sobre OSX como indutor), e não foi detectado em filtrados

de cultura das quatro cepas (isto é, CBS393;64, CBS392.64, CBS395;64 e CBS549.92). Significativa atividade (galacto)mananase foi produzida durante o crescimento sobre OSX pela cepa 393751 (mais baixa do que com TL/PPL como indutor) e CBS472.92. A Figura 6A-E compara e contrasta a produção de glucanase e de mananase sob as condições experimentais delineadas pelas cepas 393751 e CBS814.70.

Em conclusão, os resultados indicam que:

a cepa 393751 é um produtor potente de altos níveis de uma faixa de atividades enzimáticas muito importantes, a cepa 393751 é a única cepa de *T. emersonii* que produz níveis muito altos tanto de xilanase como de β -1,3;1,4-glucanase em duas atividades de polimerização hemicelulase, em indutores de baixo custo (alfarroba e TL/PPL), e níveis mais altos de atividade foram obtidos sobre fontes de carbono grosseiras assim fornecendo demonstração de que a cepa 393751 é uma fonte eficaz de custo de uma malha potente de coquetéis de enzimas.

TABELA 31A: produção de exoglicosidase segundo crescimento de 120 hrs em usando glucose como fonte de carbono

Glicose como indutor Cepas de T. emersonii (indutor IU/g)

Atividade de	IMI	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS
Exoglicosida	393751	180.68	355.92	393.64	394.64	395.64	397.64	472.92	549.9	759.71			
se		(IMI	(IMI	(IMI	(IMI	(IMI	(IMI	(IMI	2	(IMI			
		393753)	393755)	393756)	393757)	393758)	393759)	393760	(IMI	393761			
								)	39375	)			
									2)				
α -Arabinofur	3.69	5.83	6.82	5.17	6.00	6.33	2.64	4.73	4.18	3.08			
anosidase													
β -Xilosidase	0.00	0.00	1.49	0.00	0.00	1.60	0.00	1.63	0.00	2.40			
β	- 31.90	1.96	15.42	0.99	0.19	10.67	2.20	2.15	8.97	9.30			

Glucosidase																	
α -Glucosidas e	0.44	0.67						0.09	0.43	1.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.71	
β -Galactosid ase	0.28	1.16						0.00	0.55	0.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.49	
β -Manosidase	1.30	2.64						1.97	1.60	1.51	1.63	1.10	1.63	0.00	0.00	2.15	
β -Fucosidase	0.00	0.11						0.58	0.22	0.00	0.09	0.00	7.37	0.00	0.00	1.10	
N-AcetylGlucosaminidase	86.08	156.97						27.83	33.72	0.00	43.56	59.57	74.91	6.22	34.87		

Tabela 31B: produção de exoglicosidase segundo crescimento de 120 hrs usando alfarrobeira como fonte de carbono

Alfarrobeira como indutor Cepas de T. emersonii (indutor IU/g)

Atividade de	IMI	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS
Exoglicosida	393751	180.68	355.92	393.64	394.64	395.64	397.64	472.92	549.9	759.71		
se		(IMI 393753)	(IMI 393755)	(IMI 393756)	(IMI 393757)	(IMI 393758)	(IMI 393759)	(IMI 393760)	2	(IMI 393761)		
								)	39375	)		
									2)			
α -Arabinofur	0.72	0.22	3.30	1.49	7.04	1.45	1.32	1.05	2.55	1.49		
anosidase												
β -Xilosidase	7.15	0.39	10.29	1.65	0.00	0.77	2.37	16.45	2.60	11.66		
β	- 23.65	17.22	67.54	6.55	0.00	10.04	24.53	85.36	11.25	74.14		

[illegible]

Tabela 31C: produção de exoglicosidase segundo crescimento de 120 hrs usando folhas de chá/pratos de papel como fonte de carbono

Folhas de chá/pratos de papel como indutor Cepas de T. emersonii (indutor IU/g)

Atividade de	IMI	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS
Exoglicosida	393751	180.68	355.92	393.64	394.64	395.64	397.64	472.92	549.9	759.71					
se		(IMI 393753)	(IMI 393755)	(IMI 393756)	(IMI 393757)	(IMI 393758)	(IMI 393759)	(IMI)	2	(IMI 393761					
α -Arabinofur	3.30	1.10	8.53	0.00	25.74	23.93	3.08	0.88	1.87	2.53					
anosidase															
β -Xilosidase	6.93	0.00	3.08	0.00	12.49	12.82	1.98	4.18	1.93	1.43					
β	- 44.61	20.19	22.72	61.16	9.13	41.20	20.74	32.86	15.51	34.32					

[illegible]

Tabela 31D: produção de exoglicosidase segundo crescimento de 120 hrs usando xilano de trigo de aveia como fonte de carbono

Xilano de Trigo de aveia como indutor Cepas de T. emersonii (indutor IU/g)

Atividade de	IMI	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS
Exoglicosida	393751	180.68	355.92	393.64	394.64	395.64	397.64	472.92	549.9	759.71			
se		(IMI 393753)	(IMI 393755)	(IMI 393756)	(IMI 393757)	(IMI 393758)	(IMI 393759)	(IMI 393760)	2	(IMI 393761)			
								)	39375	)			
									2)				
α -Arabinofur	15.18	2.97	4.07	5.83	23.60	8.91	0.00	1.10	0.00	5.39			
anosidase													
β -Xilosidase	9.63	0.00	2.26	0.66	0.00	2.10	11.77	14.91	12.16	6.93			
β	- 32.84	16.83	42.30	24.97	0.00	26.13	15.73	67.27	3.14	61.04			

[illegible]

Substrato	IMI	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS
exame de xilano	393751	180.68 (IMI 393753)	355.92 (IMI 393755)	393.64 (IMI 393756)	394.64 (IMI 393757)	395.64 (IMI 393758)	397.64 (IMI 393759)	472.92 (IMI 393760)	549.9 2 (IMI 393761 39375 2)	759.71 (IMI 393761)		
Xilano de trigo aveia	2696.65	124.52	198.39	618.20	166.93	467.94	280.50	287.32	335.2 3	264.06		
Arabinoxilano de centeio	2398.55	102.63	180.62	522.67	260.15	399.52	441.93	281.88	114.9 5	254.49		
Arabinoxilano de trigo	2525.60	53.35	123.15	499.40	123.20	351.62	305.09	261.25	170.3 4	236.01		

Xilano de birchwood	2127.40	417.29	458.37	771.65	457.00	626.45	727.65	617.10	647.1	521.29
									3	

Tabela 32D: atividade de xilanase extracelular em filtrados de culturas de T. emersonii por 120 horas durante crescimento em xilano de trigo de aveia como fonte única de carbono

Xilano de trigo de aveia Cepas de T. emersonii (indutor IU/g)

Substrato	IMI	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS
exame de xilano	de 393751	180.68 (IMI 393753)	355.92 (IMI 393755)	393.64 (IMI 393756)	394.64 (IMI 393757)	395.64 (IMI 393758)	397.64 (IMI 393759)	472.92 (IMI 393760)	549.9 2 (IMI 39375)	759.71 (IMI 393761)
									2)	
Xilano de trigo de aveia	de 2725.25	216.15	287.87	295.35	235.35	262.68	389.95	2126.3 0	789.4 7	303.09

Arabinoxilano de centeio	2009.15	284.57	220.28	384.45	372.13	247.67	351.62	1543.30	723.80	328.35
Arabinoxilano de trigo	2722.50	180.62	265.43	297.00	191.51	197.01	220.28	1641.75	577.50	281.88
Xilano de birchwood	2196.15	548.68	567.82	695.20	550.00	489.83	584.21	1908.50	871.53	623.92

Tabela 33A: glucanase e manase extracelulares presentes em filtrados de culturas de cepas de T. emersonii por 120 horas durante crescimento glicose como fonte única de carbono

Glicose como indutor Cepas de T. emersonii (indutor IU/g)

Substrato de	IMI	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS
glucanase/ma	393751	180.68 (IMI)	355.92 (IMI)	393.64 (IMI)	394.64 (IMI)	395.64 (IMI)	397.64 (IMI)	472.92 (IMI)	549.9 (IMI)
nase		393753)	393755)	393756)	393757)	393758)	393759)	393760)	393761) 2)

Tabela 33C: glucanase e manase extracelulares presentes em filtrados de culturas de cepas de T. emersonii por 120 horas durante crescimento em folhas de chá/pratos de papel como fonte única de carbono

Folhas de chá/pratos de papel		Cepas de T. emersonii (indutor IU/g)									
Substrato de	IMI	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS	CBS
glucanase/ma	393751	180.68	355.92	393.64	394.64	395.64	397.64	472.92	549.9	759.71	
nase		(IMI 393753)	(IMI 393755)	(IMI 393756)	(IMI 393757)	(IMI 393758)	(IMI 393759)	(IMI 393760)	2 (IMI 39375)	(IMI 393761)	
									2)		
Carboximetil	318.34	76.89	246.84	34.93	0.00	64.96	109.40	166.54	7.21	221.71	
celulose											
β-glucano de	3420.45	145.64	1120.35	81.29	0.00	60.06	281.77	1150.0	45.65	1702.4	
cevada								5	3	3	

Liquenana	2162.60	135.52	429.39	47.36	0.00	32.01	203.45	431.97	19.91	914.65
Xiloglucano	180.24	40.15	89.82	45.71	0.00	43.45	39.16	48.68	10.45	112.97
Galactomanan a alfarrobeira	54.18	108.08	90.15	107.42	110.99	61.05	107.09	94.71	49.01	101.86

Tabela 33D: glucanase e manase extracelulares presentes em filtrados de culturas de cepas de T. emersonii por 120 horas durante crescimento em xilano de trigo de aveia como fonte única de carbono

5 Xilano de trigo de aveia Cepas de T. emersonii (indutor IU/g)

Substrato de glucanase/ma nase	IMI 393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.9 2 (IMI 393761)	CBS 759.71 (IMI 393761)
--------------------------------------	---------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	--------------------------------------	--	--------------------------------------

Exemplo 14**Termoenzimas de *T. emersonii* IMI393751 com potencial para produção de bioenergia**

O objeto foi reduzir o componente biodegradável de
5 dejetos clínicos ricos em celulose esterilizados, assim
reduzindo o volume de dejetos para aterros, e recuperar o
líquido enriquecido de açúcares emitido após o tratamento
com enzima e recuperar a energia na forma de bicomcombustível.

O fluxo de dejetos continha uma alta proporção de
10 celulose (>50%) e consistiu essencialmente de papel, lenços
de papel, lenços de limpeza médica e bandagens ricas em
algodão e tecidos, algodão em camada, etc. A principal
'fibra' no fluxo de dejetos é a celulose, mas muitos
produtos são 'acabados' com revestimentos de
15 polissacarídeos, agentes de ligação e enchimentos, de modo
que uma mistura de enzimas acessórias (a saber,
hemicelulase, pectinase e enzimas degradadoras de amido) é
essencial para aprimorar a acessibilidade à celulose e
melhorar a redução do dejetos ou a conversão para simples
20 açúcares solúveis (por exemplo, glicose, galactose, xilose,
etc.).

Abordagem experimental

O perfil de atividades de enzimas de endohidrolase e
de exoglicosidase em cada um dos 10 coquetéis de
25 termoenzima, derivados da cepa 393751, foram determinados
(Tuohy & Coughlan 1992; Tuohy et al., 1993, 1994, 2002;
Murray et al., 2001, 2004). A Tabela 34 resume os níveis
relativos de atividades chave determinada em uma seleção
dos coquetéis. As preparações de enzima foram acrescentadas
30 em diferentes concentrações em lotes de 100 g de STG de

dejeito rico em celulose tratado, a 50°C e a 70°C, e incubado por 24-48 horas (a níveis de umidade de 50-60%). Amostras do licor rico em açúcares (e materiais ricos em celulose, por exemplo, lenço de papel, etc.) foram removidos periodicamente durante as 48 horas e analisados quanto a (i) redução de peso e de volume, (ii) volume de licor rico em açúcares recuperado, (iii) açúcares de redução liberados, (iv) estrutura física do substrato após o tratamento enzimático (utilizando microscopia eletrônica de varredura), (v) análise qualitativa dos tipos de açúcares liberados pelo TLC, (vi) análise quantitativa dos açúcares produzidos por HPLC, GC-MS e ESI-Q-TOF-MS, (vii) substâncias potencialmente tóxicas para microorganismos de fermentação (produção de bioenergia), (viii) esterilidade dos hidrolisados, (ix) produção de bioetanol, e (x) produção de biogás, conforme descrito por Tuohy et al., 1993, 1994, 2002; Murray et al., 2001, 2004, Gilleran (2004) e Braet (2005).

Resultados

A. *Redução do peso e do volume, volume de licor rico em açúcares recuperado, açúcares de redução liberados*

Os pesos dos tratamentos pré- e pós enzimas foram registrados e estimativas da redução no volume registradas para todas as preparações de enzima que foram feitas. Os dados de redução de volume e dos açúcares de redução obtidos a 50°C, utilizando os mesmos parâmetros de reação (carregamento de enzima, 60% de teor de umidade e um tempo de reação de 24 horas), são ilustrados na Figura 7.

Em resumo, 70°C por 24 horas a 60% de umidade produziu os melhores resultados em termos de redução do volume para

todos os coquetéis. Em estudos repetidos com os 6 coquetéis selecionados (e com testes replicados), a redução de volume foi consistentemente entre ~60-75% dependendo do coquetel (ver a Figura 8). Os açúcares de redução liberados foram convertidos para % de hidrólise ou conversão da celulose presente que era entre 66-82% da fração rica em celulose presente no dejetto esterilizado inicial. Uma redução de volume de 60-75% foi obtida em testes de laboratório.

Por lote de 100 g, aproximadamente 70-100 mL de umidade acrescentada (H_2O) foram acrescentadas para trazer o teor de umidade final para 50-60%. Os volumes de recuperação do líquido, pós hidrólise enzimática, variou de 69-105 mL. Experimentos também foram completados a temperaturas de reação de 75-85°C e diferentes valores de pH. Acima de 70°C um aumento marginal (~2-5,5%) na hidrólise geral foi observado, quando comparado com valores obtidos a 70°C, e embora o pH de 3,5-4,0 produziu níveis ótimos de hidrólise, os valores não foram significativamente maiores (<5%) do que aqueles obtidos utilizando H_2O .

B. Perda física da integridade do substrato, produtos de açúcares gerados e quantidades relativas de cada tipo de açúcar

SEM demonstrou uma perda significativa na estrutura da fibra de celulose (Figura 9B).

Produtos da hidrólise: Análise qualitativa pelo TLC; Análise quantitativa pelo HPLC

>76-92% do açúcar liberado foi o monossacarídeo para os 7 melhores coquetéis, e isto consistiu principalmente de glicose, com alguma galactose, manose e xilose. Por

exemplo, níveis de açúcar variaram de 0,2-0,55 g/mL e as faixas de concentração de monossacarídeos determinada pelo HPLC foram as seguintes (dependente do coquetel de thermozyme e lote de dejetos):

5 Glicose: 43-70%; manose: 5-15%; galactose: 4-10%;
xilose: 20-30%; celobiose: 4-12% e oligossacarídeos mais
altos: 5-26%.

C. Filtragem para substâncias que são potencialmente
tóxicas para microorganismos da fermentação (produção de
10 bioenergia) antes e após a fermentação, análise da
esterilidade dos hidrolisados, e produção de bioetanol e de
biogás.

A fração líquida recuperada não pareceu ser tóxica às
espécies de levedura selecionadas para a fermentação dos
15 hidrolisados ricos em açúcares para bioetanol, isto é, não
impediram o crescimento de *S. cerevisiae* (levedo de
padeiro), *Pachysolen tannophilus*, *Pichia sp.*, *Candida*
shehatae e *Kluveromyces marxianus*. Além disso, a análise da
produção de etanol (utilizando um kit de ensaio ligado ao
20 enzima) indicou que os levedos estavam produzindo etanol.

Placas de ágar (contendo o meio de ágar apropriado)
foram inoculadas com amostras dos licores ricos em açúcares
e dejetos residuais, incubadas sob as condições
recomendadas (para o microorganismo) e analisadas para a
25 presença de colônias (bactéria e levedura) e crescimento
radial (fungos filamentosos). Nenhum crescimento microbial
ocorreu nas placas inoculadas com os licores ricos em
açúcares e amostras de dejetos dos tratamentos de enzima a
70°C, isto é, o estrago microbial (e perda de açúcar) dos
30 hidrolisados de dejetos não ocorreu.

Produção de bioetanol

A produção do bioetanol de matérias primas ricas em açúcares por diferentes espécies de levedura, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia* 5 *sp.*, *Candida shehatae* e *Kluveromyces marxianus* (e cepas) foi avaliada. Os pontos terminais mensurados incluíram o crescimento da levedura (e biomassa da levedura), a utilização de açúcares, a evolução do CO₂ e do etanol produzido. Duas das digestas de enzimas a 70°C 10 (hidrolisados gerados pelos coquetéis 5 & 8 na Figura 8) foram selecionados como as matérias primas para teste para a produção de bioetanol por todas as espécies de leveduras em culturas em escala de laboratório de 1 L.

As Figuras 10A e 10B ilustram os perfis de produção de 15 etanol obtidos com *S. cerevisiae*. As produções de etanol são similares com ambas as matérias primas, embora o coquetel de thermozyme 8 produza marginalmente mais açúcares simples no hidrolisado. No entanto, a digesta do coquetel 8 contém pentose mais alta (não fermentada por *S.* 20 *cerevisiae*) que aquela gerada pelo coquetel de thermozyme 5. A digesta do coquetel de thermozyme 5 contém alguma celobiose (e quantidades menores de celooligossacarídeos) que são facilmente metabolizados pela levedura.

Tabela 34

25 Resultados para um número de combinações de levedura +digesta rica em açúcares

Espécies de levedura	Digesta do coquetel de thermozyme 5	Digesta do coquetel de thermozyma 8
<i>S. cerevisiae</i>	9,2 g/L de etanol	9,4 g/L de etanol

<i>P. tannophilus</i>	8,5 g/L de etanol	8,8 g/L de etanol
<i>K. marxianus</i>	9,6 g/L de etanol	8,4 g/L de etanol
<i>A. pullulans</i>	6,7 g/L de etanol	7,4 g/L de etanol
<i>C. shehatae</i>	6,3 g/L de etanol	5,4 g/L de etanol

Análise de produtos de final da fermentação potencialmente tóxicos

Uma gama de técnicas (HPLC, MS), especialmente GC-MS, foram utilizadas para determinar a presença de produtos de final de fermentação potencialmente tóxicos. Quase completa utilização dos açúcares foi alcançada (com a exceção de digestas ricas em açúcares pentose (xilose, arabinose) para *S. cerevisiae*, e produtos de final de fermentação normais foram detectados, isto é, glicerol, acetato e algum traço de sub-produtos (solventes).

Produção de biogás

Lotes maiores da digesta dos coquetéis 5 e 8 foram preparados para alimentar digestores Upflow Anaerobic Hybrid Reactor (UAHR - Reator Híbrido Anaeróbico de Fluxo Ascendente) mesofílico e termofílico. Os níveis de carboidratos totais dos influentes e dos efluentes de ambos os reatores foram mensurados (Dubois et al. 1956; Protocolo de laboratório). Os açúcares de redução presentes em amostras influentes e efluentes foram determinados (Tuohy et al., 1994). Para determinar a Demanda de Oxigênio Químico (COD - Demanda de Oxigênio Químico), um volume conhecido do hidrolisado foi oxidado utilizando dicromato de potássio (ácido sulfúrico concentrado com sulfato de prata como catalisador), por duas horas (método de teste internacional; protocolo de laboratório). O dicromato restante foi determinado por titulação com uma solução

padronizada de sulfato de amônia ferroso. COD e a eficiência da remoção de carboidrato foram mensurados (amostras diárias) por todo o experimento. A atividade metanogênica específica (SMA) das lamas foram analisadas utilizando a técnica de transdutor de pressão (Colleran e Pistilli, 1994; Coates et al., 1996). Uma amostra da lama foi removida da cama de lama através de uma porta de saída e testes foram realizados quer a 37°C (para a lama do reator mesofílico) ou 55°C (para a lama do reator termofílico).

Os açúcares presentes na digesta gerada enzimaticamente foram metabolizados rapidamente pelas bactérias tanto nos UAHRS mesofílicos (37°C) como no termofílico (55°C), isto é, redução de 95-97% do carboidrato nas taxas de carregamento de 4,5 g COD/m³/dia, sob condições não-otimizadas. Os níveis de metano no fluxo de biogás obtido foram entre 55-61%, e o tempo de retenção (dias) estimado tomado para metabolizar todo o açúcar e atingir níveis de metano máximos foi de ~3,0-4,0 dias. O pH do efluente foi monitorado e não houve qualquer mudança observável no pH dos efluentes de qualquer dos reatores.

C. Otimização dos sistemas thermozyne para o tratamento de fluxos de dejetos clínicos ricos em celulose

Uma combinação de genômica e proteômica funcional foi utilizada para identificar as condições de crescimento ótimo e os substratos a utilizar (com base na informação dos 10 coquetéis utilizados nos experimentos iniciais) para obter um coquetel de enzimas que teria níveis ótimos de todos os componentes de enzimas chaves. Duas combinações de indutores foram selecionadas: uma mistura 1:1 de folhas de

chá usadas e dejetos de pratos de papel, e uma mistura 1:1 de sorgo e polpa de beterraba não caramelada. Misturas adicionais de coquetéis selecionados dos 10 utilizados acima também foram preparadas. O novo coquetel e as 5 misturas foram caracterizadas com relação às enzimas componentes e sua capacidade de catalisar extensa conversão de celulosas comerciais, hemicelulosas, e dejetos ricos em celulose esterilizados para açúcares fermentáveis simples. pH e temperatura ótimos para a reatividade máxima da 10 enzima, a estabilidade térmica do sistema de enzima otimizado e coquetéis misturados, e inibição potencial pelos produtos finais da reação, os açúcares simples, ou moléculas potencialmente tóxicas (compostos fenólicos/derivativos de benzina) foram determinados.

15 **Temperatura ótima**

75-80°C com >70-85% de atividade restante a 85°C, dependendo da preparação de enzima/mistura (a atividade da enzima ainda foi detectada a 90-95°C).

Estabilidade térmica

20 Nenhuma perda real de atividade após 24 horas a 50°C e <5-10% de perda da atividade após uma semana à mesma temperatura.

A 70°C, <2-20% de perda de atividade nas primeiras 24 horas, com <10% de mais perda de atividade daí em diante 25 por um período de cinco dias.

pH ótimo

Embora as enzimas fossem mais ativas entre o pH de 4-5, >60% da atividade foi observada no pH de 3,0 e no pH de 6,8, com todas as enzimas ainda exibindo atividade no pH de 30 7,0. As preparações de enzima eram mais estáveis entre pH

de 3,5-6,0 (4-50°C por um período de uma semana).

Embora a taxa de reação/conversão do substrato para monossacarídeos de fato diminuiu ou atingiu um patamar em que altas concentrações de glicose e outros monossacarídeos estavam presentes, as preparações de enzima ainda estavam bastante ativas na presença de altas concentrações (até 100 mM) de monossacarídeos (glicose, xilose, arabinose, galactose). Além disso, embora os compostos fenólicos/derivativos de benzeno de fato diminuíssem a atividade geral dos coquetéis, as concentrações utilizadas nos testes foram significativamente maiores do que o potencialmente presente no dejetto. Apesar disso, certos coquetéis e o coquetel de enzimas otimizado exibiram atividade significativa (>50-70%) na presença desses compostos.

No todo, as concentrações de cada enzima necessária para atingir valores de hidrólise de ~65-75% foram surpreendentemente baixas. (9=16 unidades de celulase/10 g de dejetto) e, embora dependente do coquetel/mistura, doses mais altas (até 60 unidades de celulase) não aumentaram o grau final da hidrólise acentuadamente. O escalamento para cima do tratamento de enzima para lotes de 100 e 10 Kg produziram um grau final semelhante de hidrólise, e um perfil similar e concentração dos produtos de açúcares. Os melhores valores de redução de volume obtidos para os coquetéis otimizados foram de 73-80%, enquanto os valores de % de hidrólise correspondente para a conversão da fração celulósica para açúcares simples foram de 72-81%. Duas das misturas otimizadas produziram pontos terminais similares em termos da redução de volume e da hidrólise da celulose.

A produção de etanol obtida foi de 195-210 L/ton. com *S. cerevisiae* e 215-220 L/ton. com *P. tannophilus*. Aproximadamente, 80-85% do bioetanol poderia ser recuperado por destilação, mas isto poderia ser melhorado.

5 Exemplo 15

Termoenzimas de *T. emersonii* IMI393751 para a geração de matérias primas ricas em açúcares, de dejetos de papéis e de lenços de papel ricos em celulose

Medições da atividade da enzima

10 Preparações de enzimas grosseiras foram analisadas para uma gama de diferentes atividades de lignocelulose-hidrólise de enzimas utilizando 10-30 mg/L de concentrações dos substratos relevantes para enzimas endo-atuantes, papel de filtro de 50 mg/mL de volume de reação para 'paperase de
15 filtro' (celulase geral) ou 1 mM do derivativo 4-nitrofenil-glicoside apropriado (Tuohy et al., 2002; Murray et al., 2001). Ensaio foram efetuados em triplicata. Todos os resultados são representativos de dois experimentos idênticos utilizando preparações de enzima grosseiras
20 diferentes.

Requisitos de pH e de temperatura para atividade e estabilidade

Os requisitos de pH e de temperatura para a atividade enzimática e a estabilidade foram avaliados sobre a faixa
25 de pH de 2,6-7,6, e sobre a faixa de temperatura que variou de 30-90°C, utilizando os procedimentos de ensaio normais.

Estudos de hidrólise em escala modelo

Uma alíquota de enzimas individuais, contendo 5-60 FPU (ou 2-20 unidades de xilanase, conforme apropriado), foi
30 incubada com 1 g do substrato alvo, no pH e temperatura de

reação apropriados, para até 24 horas. Amostras foram removidas a intervalos cronometrados e o teor de açúcares (açúcares de redução) e a composição analisados.

Substratos ricos em celulose investigados

- 5 Papel de lenço de papel e de lavatório mistos, dejetos de papel de escritório, papel de embrulho, jornais mistos.

Resumo dos resultados

- Os coquetéis de thermozyne exibiram alta atividade em um amplo espectro de substratos de carboidratos e assim
10 refletem a complexidade e a eficiência da produção de enzimas por *T. emersonii* IMI393751. A produção de termoenzimas particulares refletiu a composição e a variação do substrato indutor (Tabela 35).

Tabela 35

- 15 Quantidades relativas de enzimas de hidrólise de celulose e de hemicelulose

Atividade	Coqueté is	Indutor IU/g					
	MGBG 2	MGBG 3	MGBG 4	MGBG 5	MGBG 6	MGBG 7	MGBG 8
β -glucosidase	26,4	240,35	90,75	134,2	114,4	119,9	36,85
Endocelulase	710,6	468,6	310,2	747,45	799,15	70,4	919,6
Endo1,3;1,4- glucanase	4471,5	3199,0	2067,4 5	8004,7	9493	313,5	6207,8 5
Endoxilanase	1234,2	1646,1 5	1051,6	1429,4 5	1369,5	653,95	1731,4
Filterpaperas e	216,7	205,7	271,15	155,65	146,85	105,6	172,15
β -xilosidase	8,25	4,125	9,24	11,77	11,715	5,17	5,335
α - arabinofurano	4,29	33,33	17,105	34,87	20,24	7,205	23,155

sidase							
β - galactosidase	10,175	137,5	6,82	42,79	13,695	1,98	115,5
Pectinase	173,25	358,6	119,9	168,85	157,3	19,25	429,55

MGBG 2, derivado de culturas de *T.emersonii* de 108 horas criadas em uma mistura de 1:1 de folhas de chá usadas/papéis de prato; MGBF 3, derivado de culturas de *T. emersonii* de 120 horas criada em uma mistura de 1:1 de
5 sorgo/polpa de beterraba; MGBG 4, derivado de culturas de *T. emersonii* de 120 horas criadas em uma mistura de 1:1 de farelo de trigo/polpa de beterraba; MGBG 5, derivado de culturas de *T. emersonii* de 120 horas criadas em uma mistura de 1:1 de pratos de papel/polpa de beterraba; MGBG
10 6, derivado de culturas de *T. emersonii* de 120 horas criada em uma (2:1:1) mistura de papel de embrulho/pratos de papel/polpa de beterraba; MGBG7, derivado de culturas de *T. emersonii* de 120 Horas criada em uma mistura de 1:1 de flocos de centeio/farelo de trigo; MGBG 8, derivado de
15 culturas de *T. emersonii* de 120 horas cultivadas em uma mistura de 1:1 de polpa de beterraba/folhas de chá usadas.

Celulase nos coquetéis de thermozyne foram mais ativos ao redor de pH de 4,0 (Figura 11A) e entre 70°C e 80°C (Figura 12). Os componentes da celulase em cada preparação
20 de enzima são ativos por uma ampla gama de pH (<pH de 2,6- >pH de 6,5). A atividade de xilanase presente nos mesmos coquetéis foi mais ativa ao pH de 4,0-5,0 (Figura 11B) e entre 75°-85°C (Figura 13). No entanto, a atividade de xilanase nos coquetéis estava ativa sobre uma ampla gama de
25 pH (<pH de 2,6 a >ph de 7,0) enquanto níveis de atividade similares foram observados a 90°C e a 50°C.

A estabilidade térmica de vários dos coquetéis MGBG (listados na Tabela 35) foi refletida nos longos valores de meia-vida a 50°C e a 70°C, isto é, efetivamente nenhuma perda mínima em atividade de endoxilânase ou de endocelulase a 50°C após a incubação apenas em tampão (pH de 5,0). Todos os coquetéis eram preparações de enzima grosseiras e nenhum estabilizador ou aprimorador foi acrescentado. A atividade de xilanase presente nos coquetéis 2, 5, 6 e 8 foi particularmente estável a 70°C (apenas ~2-20% de perda de atividade de xilanase após 25 horas). Por exemplo, o valor $t_{1/2}$ do coquetel 2 a 70°C foi de 6 dias. As estabilidades a 70°C dos coquetéis 3 e 4, e em grau menor o coquetel 7, foram mais baixos devido a presença de altos níveis de eqolisin protease (valores de $t_{1/2}$ de 2 horas, 12 horas e 25 horas). Na presença do substrato (isto é, dejetos grosseiros), a estabilidade de todos os três coquetéis foi acentuadamente maior, isto é, (valores de $t_{1/2}$ de 22 horas, 46 horas e 72 horas). O desempenho geral dos coquetéis MGBG em celulose e substratos de hemicelulose foi muito alto (Tabela 36). O nível de hidrólise aumentou significativamente quando a temperatura de reação foi aumentada de 50°C para 70°C (Tabela 37). Nas temperaturas de reação mais altas (por exemplo, 70°C), o % de hidrólise foi atingido em 18 horas e foi similar, e em alguns casos maior, do que o % de hidrólise obtido após 24 horas a 50°C (Tabela 37). Este resultado destaca a vantagem dos termoenzimas comparado com as enzimas de organismos mesofílicos, que estariam ativos a temperaturas mais baixas.

% de hidrólise de materiais ricos em celulose

Substrato	Coquetéis	% de hidrólise (50°C)					
	2	3	4	5	6	7	8
Lenço de papel de lavatório	37,9	85,6	9,8	9,7	47,4	22,4	22,6
Copos de papel	17,6	20,0	16,1	27,5	34,2	16,3	26,2
Papel de filtragem	18,3	23,7	7,2	17,4	18,8	0,0	20,7
β -glucano de cevada	72,6	90,1	60,2	83,3	80,4	78,7	61,9

Tabela 37**% de hidrólise de lenço de papel rico em celulose**

	MGBG 2	MGBG 3	MGBG 4	MGBG 5	MGBG 6	MGBG 7	MGBG 8
24 horas a 50°C	70	87	51	79	80	66	71
18 horas a 70°C	68	89	68	66	74	61	67

Os produtos da hidrólise no decurso de tempo da
 5 celulose e da hemicelulose, que foram analisados pelo TLC,
 conformaram a alta eficiência de conversão dos termoenzimas
 MGBG. Os substratos de polissacarídeos foram inicialmente
 degradados para oligossacarídeos e finalmente para glicose,
 que era quase o único produto da hidrólise, enquanto a
 10 celulose presente em dejetos ricos em celulose, por
 exemplo, lenço de papel eram similarmente hidrolisados
 quase que completamente para glicose.

As implicações desses resultados para a indústria com
 base no bioetanol são significativos e indicam o potencial
 15 dos sistemas thermozyme de *T. emersonii*.

Exemplo 16

**Bioconversão da polpa de beterraba para hidrolisados
 ricos em açúcares para a produção de bioetanol**

Oito coquetéis de thermozyme foram selecionados de uma
 20 faixa inicial de 20 coquetéis. O perfil de atividades de

enzima de endohidrolase e de exoglicosidase em cada um dos 8 coquetéis, derivados da cepa 393751, foram determinados (Tuohy & Coughlan, 1992, Tuohy et al., 1993, 1994, 2002; Murray et al., 2001, 2004).

5 As preparações de enzima foram combinadas em concentrações ou dosagens diferentes com lotes de 1 g de frações de beterraba açucareira, preparadas utilizando métodos de extração diferentes. As frações foram as seguintes:

10 A. Topos e pedúnculos da beterraba açucareira (1 g de peso seco/10 ml de volume total)

B. Polpa da beterraba açucareira (1 g de peso seco/10 ml de volume total)

C. Fruto da beterraba açucareira (1 g de peso seco)

15 D. Casca da beterraba açucareira (1 g de peso seco)

As frações de beterraba açucareira A-D foram homogeneizadas em um liquidificador Waring (2 rajadas de 30 segundos). Aliquotas de enzima, isto é, de 2 ml e de 5 ml das soluções de enzima (1-8) foram acrescentadas a um
20 volume de reação total final de 10 ml (com água de bica, pH 7,2) e incubadas a 63°C inicialmente. Outros experimentos foram conduzidos para otimizar a temperatura de reação (75°C), pH (pH de 4,0) e para reduzir o tempo de incubação (16 horas). Amostras foram tomadas a intervalos
25 cronogramados durante a incubação de 16-48 horas, centrifugadas, e a ação enzimática terminada ao ferver a 100°C por 10 minutos. A fração supernatante foi analisada quanto aos açúcares liberados.

A análise qualitativa dos tipos de açúcares liberados
30 foi analisada pelo TLC, e a análise quantitativa dos

açúcares produzidos foi determinada pelo HPLC. Matérias primas ricas em açúcares foram avaliadas quanto à produção de bioetanol (Tuohy et al., 1993, 1994, 2002; Murray et al., 2001, 2004; Gilleran, 2004; Braet, 2005).

5 Resultados

As condições de reação ótimas foram 75°C e pH de 4,0. A Tabela 38 apresenta os açúcares de redução liberados após 16 horas sob condições ótimas. Aumentar a incubação para 48 horas aumentou o % de hidrólise no caso da casca e das frações do fruto. A otimização das condições de carregamento da enzima permitiu que o tempo de incubação fosse diminuído pela metade (isto é, 24 horas) com as produções mostradas na Tabela 39.

Tabela 38

15 % de hidrólise dos carboidratos presentes após 16 horas a 75°C

Substrato	Coquetéis	% de hidrólise (75°C) - após 16 h					
	2	3	4	5	6	7	8
Polpa	35,5	91,1	48,8	38,5	59,8	37,4	48,6
Casca	12,8	32,7	5,8	14,8	7,8	9,8	20,0
Fruto	13,8	6,4	3,0	26,0	11,5	3,0	28,7

Tabela 39

% de hidrólise dos carboidratos presentes após 24 horas a 75° com carregamentos de enzima otimizados

Substrato	Coquetéis	Hidrólise (75°C) - mg RS após 48 h					
	2	3	4	5	6	7	8
Polpa	84,4	80,8	85,4	88,4	69,9	82,5	90,0
Casca	86,3	79,8	38,5	53,2	77,5	81,6	67,5
Fruto	66,6	75,5	59,1	104,1	79,5	85,4	102,2

O desenvolvimento e a otimização de um coquetel de enzimas para efetuar a hidrólise foi efetuado utilizando uma combinação de genômica e proteômica funcional (com base na informação dos 8 coquetéis utilizados nos experimentos 5 iniciais). Dois coquetéis foram produzidos, rotulados MGBG SB#1 e MGBG SB#2. A hidrólise da planta de beterraba açucareira total e o componente do fruto total pelos dois coquetéis otimizados foram comparados aos coquetéis 3 e 5 dos experimentos anteriores. As reações foram conduzidas 10 nas condições ótimas para os dois coquetéis novéis, isto é, 71°C e pH de 4,5. A Tabela 40 dá os níveis relativos de enzimas incluídas em cada reação por g de substrato (isto é, planta de beterraba açucareira total ou o componente do fruto total). As Tabelas 41 e 42 resumem os resultados 15 obtidos pela hidrólise.

Tabela 40

Carregamentos de enzimas por substrato de beterraba açucareira

Atividade	Coquetel 3	Coquetel 5	MGBG SB#1	MGBG SB#2
Xilanase	4,8	4,98	0,68	0,20
Celulase (Fpase)	1,64	1,12	0,12	1,22
Pectinase	0,96	2,26	0,30	0,56

As principais diferenças entre os coquetéis otimizados 20 e os coquetéis 3 e 5 foram nas quantidades relativas de atividades chaves, especialmente exo-glicosidasas.

Tabela 41

% de hidrólise com base nos açúcares de redução liberados (71°C, pH de 4,5) após 24 horas

	Coquetéis (% de hidrólise) RS
--	-------------------------------

Substrato	3	5	MGBG SB#1	MGBG SB#2
Fruto da beterraba	56,8	46,9	65,6	58,3
Planta total	51,8	68,3	97,5	87,8

Tabela 42

% do total de açúcares liberados que corresponde à glicose

	Coquetéis			
Substrato	3	5	MGBG SB#1	MGBG SB#2
Beterraba	116,8	90,3	112,0	97,9
Planta total	95,0	65,6	67,1	43,2

Ambos os coquetéis novos liberaram altos níveis de açúcar de redução do homogeneizado da planta total. Dos açúcares de redução liberados aproximadamente 88-90% foi de monossacarídeo do qual aproximadamente 43-67% foi glicose.

Fermentação para bioetanol

Foram realizados estudos para investigar a produção de bioetanol dos hidrolisados da planta total e da beterraba. Mais de 90% da glicose presente no hidrolisado da planta total foi convertido para bioetanol por *S. cerevisiae* (de 40 g/L de açúcar fermentável, aproximadamente 9,0 g/L de etanol foram obtidos). Outras espécies de leveduras foram investigadas para a produção de bioetanol (condições aeróbicas), por exemplo, *Pachysolen tannophilus*. Esta última levedura utilizou os açúcares da glicose e pentose liberados (xilose e arabinose) em repetidas fermentações (>92-95% metabolismo). No entanto, as produções de etanol foram ligeiramente mais baixas do que com *S. cerevisiae* (de

40 g/L de açúcar fermentável, aproximadamente 6,7 g/L de etanol foram obtidos).

Propriedades bioquímicas selecionadas dos coquetéis novos

5 Temperatura ótima

75-80°C, com >75-87% de atividade restante a 85°, dependendo do coquetel.

Termo-estabilidade

Nenhuma perda real de atividade após 24 horas a 50°C e
10 <10% de perda após 3 semanas a 50°C.

pH ótimo e estabilidades

Embora ambos os coquetéis terem sido mais ativos ao pH 4,5, >55% de atividade foi observada ao pH <2,6 e >50-60% ao pH 6,8; ambas as enzimas exibiram atividade
15 significativa (>48-58%) ao pH de 7,0. As preparações de enzima foram mais estáveis entre o pH de 3,5-6,0 (4-50°C, por um mês).

Exemplo 17

Identificação e propriedades selecionadas de um
20 xilanase bi-funcional novel produzido por *Talaromyces emersonii* IMI393751

Talaromyces emersonii secreta entre 14-20 componentes de endoxilanase quando criado na fonte de carbono apropriada. Treze dessas endoxilanasas foram purificadas
25 até a homogeneidade e caracterizada com relação a propriedades catalíticas. Os pesos moleculares das endoxilanasas purificadas variam entre 30-130 kDa. A expressão de xilanase e de glucanase não é equivalente entre 10 cepas de *T. emersonii* criadas sob condições
30 idênticas no mesmo meio de nutriente e indutores de

carbono. Uma nova xilanase de peso molecular baixo foi identificada, Xyn XII (17,5 kDa) do sistema de degradação de xilano da cepa de *T. emersonii* IMI393751. A secreção de xilanases com valores de M_r inferior ou igual a 210 kDa foi reportada para um número de outras espécies bacteriais e fungais, mas não para *T. emersonii* antes disto.

Purificação e caracterização da enzima

T. emersonii IMI393751 foi criado em uma mistura de 1:1 de farelo de trigo e polpa de beterraba por 120 horas a 45°C, 22 rad/s (ou alternativamente por 11 dias em fermentação sólida (estática), 33% de substrato: 67% de umidade; 45°C). Xilanase e teor de proteína das amostras de enzima grosseira e fracionada foram analisadas conforme descrito anteriormente (Tuohy & Coughlan, 1992; Tuohy et al., 1993, 1994; Murray et al., 2001). O extrato de enzima grosseiro foi colhido conforme descrito anteriormente (Tuohy & Coughlan, 1992). Ultrafiltração utilizando um sistema Amicon DC2, equipado com um dializador de fibra oca H1P 10-43 foi utilizado para separar a xilanase nova (fração de permeado) das xilanases de peso molecular mais alto (retentado). Xyn XII foi purificado para homogeneidade utilizando uma combinação de técnicas de fracionamento, incluindo 'salgar para fora' ou precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-90% corte), cromatografia de permeação de gel (GPC) em Sephacryl S-200 SF (100 mM NaOAc como tampão, pH de 5,0 como eluente), cromatografia de troca de íon (IEC) no Whatman DE-52 (equilibrado com 30 mM NaOAc como tampão, pH de 5,0; a xilanase foi eluída pela aplicação de um gradiente 0,0-0,3 M NaCl), seguido por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) em fenil Sefarose CL-4B

(equilibrado com 15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 30 mM de NaOAc, pH de 5,0). Antes do HIC, a amostra de xilanase foi 'salgada para dentro' com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até uma concentração final de 15% (w/v). Sais de tampão e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram removidos pela
5 aplicação da amostra ao Sephadex G-25 (não mostrado aqui). Finalmente, as frações ricas em xilanase foram fracionadas ainda mais pela aplicação a uma segunda coluna de intercâmbio de ânions de DE-52, ao pH de 7,0, seguido pela cromatografia de permeação de gel em Sephacryl S-100 RH
10 (100 mM NaOAc como tampão, pH de 5,0 utilizado como tampão de equilíbrio e de irrigação) e uma etapa final de fracionamento em DEAE-Sefarose, pré-equilibrado com 50 mM NH_4OAc como tampão, pH de 5,5 (0,0-0,2 M de NaCl de gradiente utilizado para eluir a xilanase). A enzima
15 agrupada foi dessalinizada pela aplicação do Sephadex G-25 ou do BioGel P-6 e liofilizada antes da análise eletroforética.

Propriedades selecionadas da nova xilanase bi-funcional

Propriedades físico-químicas seletas

20 A pureza da nova enzima foi confirmada pela eletroforese em gel SDS-poliacrilamida em 15% (acrilamida/bis-acrilamida) gel, de acordo com o método de Laemmli. SDS-PAGE revelou uma única banda de proteína em tingimento a prata que correspondeu a um M_r estimado de
25 17,5 kDa. Ademais, uma única banda de proteína foi obtida no IEF correspondente a um valor de pI de pH 5,0 para Xyn XII. O ótimo de temperatura para a degradação catalisada de Xyn XII de OSX foi determinada como sendo de 75°C e o pH ótimo para a atividade foi pH de 4,0-4,5. No entanto,
30 diferentemente de Nyn I-XI, que perderam entre 25-81% das

atividades originais respectivas durante um período de incubação de 10 minutos ao pH de 3,0, Xyn XII foi admiravelmente estável sob acidez e reteve mais de 91% de sua atividade original ao pH de 3,0 mesmo em uma incubação
5 extensa.

Propriedades catalíticas selecionadas

Alíquotas adequadamente diluídas de Xyn XII foram incubadas com uma faixa de polissacarídeos, incluindo vários xilanos, β -glucanos, polímeros pécticos e frutano
10 (tudo a 1,0% (m/v) de concentração). Açúcares de redução liberados durante um período de incubação extenso de 30 minutos foram quantificados conforme descrito acima. A atividade contra aril-glicosídeos (1,0mM) foi determinada utilizando um método de micro ensaio (Murray et al., 2001).
15 Estudos preliminares para determinar as constantes cinéticas foram realizados ao variar [substrato], xilano, entre 0,2-25 mg/ml, sob as condições normais de ensaio.

Os resultados apresentados na Figura 14 ilustram a reatividade relativa da nova xilanase (Xyn XII) contra
20 diferentes xilanos. Esta enzima é mais ativa em um enlace misto, xilano não substituído (1,3:1,4- β -D-xilano) conhecido como rodimenano da alga vermelha *Palmaria palmata*. Em contraste, dos dois arabinoxilanos de cereais, isto é, OSX e WSX, a enzima exibiu maior atividade contra a
25 WSX mais substituída. O padrão geral de reatividade foi: RM>WSX>LWX>OSX>BWX. Como as Figuras 15A-G demonstram, as preferências de substrato de um número das outras xilanases (Xyn IV a Xyn XI) são bastante distintos de Xyn XII.

Com Xyn IV, OSX>RM>WSX>ÇWX>>>BWX (Figura 15A). A ordem
30 de reatividade com Xyn VI é OSX>LWX>RM>BWX>WSX (Figura

15B), enquanto aquela exibida pela Xyn XII é RM>LWX>WSX>>LWX>>OSX (Figura 15C). A reatividade de Xyn VII foi RM>BWV>WSX>>LWX>OSX (Figura 15D), e Xyn IX foi RM>LWX>BWV>OSW>WSX (Figura 15E). Finalmente, Xyn X exibiu a

5 seguinte preferência RM>>BWV-WSX>OSX>>>LWX (Figura 15F e Xyn VI RM>LWX>WSX>BWV>OSX (Figura 15G). Ademais, diferentemente de Xyn I-XI que eram estritamente ativos contra xylans apenas, a nova xylanase bifuncional (Xyn XII) exibiu atividade substancial contra os aril- β -xilosides 4-

10 nitrofenil β -D-xiloside (4NPX) ecloronitrofenil β -D-xiloside (CNPX), com maior atividade contra este último substrato (Figura 17). Este resultado poderá refletir o efeito de retirada por eletrônica da moiedade cloro, tornando o grupo de clorinitrofenil um melhor 'grupo de

15 saída'. No entanto, outras endoxilanasas novas da cepa CBS814,70 de *T. emersonii* (Tuohy et al., 1993; também produzido pela cepa IMI393751, embora expressa diferencialmente) são significativamente ativos contra CNPX e exibem pouca ou nenhuma atividade contra 4NPX. Este

20 fenômeno refletiu as características de ação 'exo' parciais dessas enzimas, e também poderá refletir uma característica similar para Xyn XII. Além disso, foi observada atividade baixa contra 4NP β -glucoside e CNP- β -celobioside, que não é inesperado pois Xyn XII é ativo

25 contra 1,3:1,4- β -D-glucano e se ele possui algumas propriedades de ação exo-, conforme observado com o aril β -xilosides, poder-se-ia esperar ter atividade correspondente contra o aril β -glucosides. Não foi observada reatividade contra qualquer outro aril glicosides ligado a α ou β .

30 Assim, "in vivo", esta nova xilanase bifuncional

poderá interpretar um papel muito importante para *T. emersonii* IMI393751 ao fornecer acesso à hemicelulose da parede da célula da planta, por exemplo, ao degradar glucanos de enlace misto em cereais e outras plantas,
 5 resíduos de plantas e dejetos.

Exemplo 18

Expressão de hidrolases chaves e outras enzimas acessórias pelas cepas de *T. emersonii*

A expressão das enzimas chaves na mesma fonte de
 10 carbono é diferente

O número, o tipo e a abundância relativa das xilanases produzidas pelo *T. emersonii* IMI393751 e outras cepas é diferente. Como foi mostrado anteriormente, níveis de enzima em filtrados de cultura são acentuadamente
 15 diferentes e sugerem que as cepas de *T. emersonii* ou produzem níveis diferentes das mesmas xilanases, ou expressam isoformas diferentes. Para ilustrar este ponto, o tingimento de zimograma após a eletroforese SDS-PAGE em gel
 20 e IEF foi conduzida com os filtrados da cultura das cepas IMI393751 e CBS549,92. Esses estudos confirmaram que (i) diferentes xilanases são expressas e (ii) o número de isoformas de xilanase expressas são acentuadamente diferentes.

25 Os resultados obtidos para a expressão de xilanase em alfarroba são resumidos conforme segue: as isoformas de xilanase detectadas (ver Tuohy et al., (1994) para referência às isoformas -pI e M_r)

IMI393751

30 Xyn IV, Xyn V, Xyn VI, Xyn IX e Xyn XI, Xyl I (b-

xilosidase) e Xyl II

CBS649,92

Xyn II, Xyn VII (nota: Xyn VII é idêntico à sequência publicada em uma patente anterior (GenBank Accession Number AX403831) e quantidades muito baixas de Xyl I (β -xilosidase). Além disso, IMI393751 é a única cepa que produz Xyn XII durante o crescimento em folhas de chá/pratos de papel (e apenas em folhas de chá).

Padrão de expressão é diferente em fontes de carbono diferentes

O padrão da expressão de xilanase em diferentes fontes de carbono é não-equivalente, isto é:

IMI393751

Glicose como a fonte de carbono: Xyn I, Xyn VIII, uma quantidade menor de Xyn XI e nenhuma β -xilosidase

Alfarroba: Xyn IV, Xyn V, Xyn VI, Xyn IX e Xyn XI, Xyl I (β -xilosidase) e Xyl II

TL/PPÇ: Xyn III, Xyn V, Xyn IX, Xyn X, Xyn XII, Xyl I e Xyl II

CBS549,92

Glicose: Baixos níveis de um componente que pode ser equivalente a Xyn IV e nenhuma β -xilosidase

Alfarroba: Xyn II, Xyn VII e quantidades muito baixas de Xyl I (β -xilosidase).

TL/PPL: proteínas similares a Xyn I, Xyn VII e Xyn IX, alguma Xyl I

Além disso, outros exemplos claros de diferenças na expressão foram observados, por exemplo, a expressão Xyl I. Nenhum Xyl I é expresso por IMI393751, CBS549,92, CBS180,68, CBS393,64, CBS394,64, ou CBS397,64 durante o

crescimento em glicose. Em contraste, sob condições idênticas, Xyl I é expresso por CBS355,92, CBS395,64, CBS472,92 e CBS759,71.

De modo similar, em alfarroba, Xyl I é expresso por todas as cepas, embora a níveis acentuadamente diferentes, com a exceção de CBS394,64. Xyl I também é expresso por todas as cepas, exceto CBS180,68 e CBS394,64 durante o crescimento em TL/PPL. Em OSX como fonte de carbono, Xyl I não foi expresso por CBS180,68 e CBS394,64, mas foi expresso por CBS393,64 (níveis baixos) e todas as demais cepas. Diferenças gerais acentuadas nos níveis de expressão de Xyl I e o padrão de expressão foi observado (isto é, as cepas que expressam as quantidades maior ou menor de Xyl I) entre todos os substratos indutores.

15 **Diferenças na atividade específica de homólogos produzidos por cepas diferentes**

As cepas diferentes foram comparadas com relação à expressão de xilanases chaves conforme descrito acima. Entretanto, além disso, as xilanases presentes em culturas induzidas de IMI393751 e CBS549,92 foram fracionadas e a atividade específica dos componentes de xilanase purificados comparados. No primeiro caso, apenas IMI393751 parece produzir Xyn VII. Ainda, quando as atividades específicas foram comparadas (os resultados para OSX como substrato de ensaio são apresentados abaixo), algumas diferenças em atividade específica das enzimas individuais foram claramente observadas (Figura 18).

25 **Produção de componentes novos por *T. emersonni* IMI393751 durante crescimento em fontes de carbono diferentes**

30

T. emersonii IMI393751 foi cultivado em uma faixa de fontes de carbono e perfilado pela renaturação de SDS-PAGE e IEF, seguido de tingimento de zimograma, conforme delineado acima. O que segue são uma amostra de alguns dos resultados obtidos:

(i) **Folhas de chá como indutor:** Xyn III, Xyn V, Xyn IX, algum Xyn X e Xyn XII; Xyl I e Xyl II

(ii) **Alfarroba:** Xyn IV, Xyn V, Xyn VI, Xyn IX e Xyn XI; Xyl I e Xyl II

10 (iii) **Farelo de centeio:** Xyn IV, Xyn V, Xyn VI, Xyn IX, com um componente de 'xilanase' novel extra de pI 6,5; Xyl I (β -xilosidase) e Xyl II retal

(iv) **Farinha de varejo:** Xyn III, Xyn VI, Xyn VIII, Xyn IX, Xyn X, Xyl I (β -xilosidase) e Xyl II, com componente
15 de 'xilanase' novel adicional de pI 5,8

(v) **Sorgo:** Xyn I, Xyn VIII, Xyn IX, Xyn X, Xyn XI, algum Xyl I (β -xilosidase) e Xyl II

(vi) **Xilose:**

Xyn I e Xyn VIII, Xyl I

20 (vii) **Glicose:** Xyn I, Xyn VIII, uma quantidade menor de Xyn XI e nenhuma β -xilosidase

Exemplo 19

Expressão diferencial de outras enzimas acessórias por cepas de *T. emersonii* de Glutathione Peroxidase

25 Amostras de filtrado de cultura (amostras não-concentradas e concentradas) foram processadas em 7,5% de gels PAGE nativo, umedecido em glutathione reduzido a 50°C seguido de incubação com 0,002% de H_2O_2 . O gel foi então tingido com 1% de cloreto férrico/1% de ferricianeto de
30 potássio. Tingimento de zimograma também foi complementado

por ensaios de enzima nos filtrados de cultura.

IMI393751 produz Glutathione peroxidase ($M_r \sim 45$ kDa), com expressão diferencial sendo observada em um número de indutores de carbono (os números 1-18 representam indutores diferentes). Em contraste, nenhuma atividade extracelular foi observada para qualquer uma das outras cepas de *T. emersonii*, mesmo nas amostras concentradas. A cepa IMI393751 também produz níveis significativos de glutathione peroxidase extracelular durante o crescimento em TL/PPL.

Catalase

Amostras de filtrado de cultura (amostras não-concentradas e concentradas) foram processadas em 7,7% de gels PAGE nativo, seguido por incubação com 3% de H_2O_2 . O gel foi então tingido com 1% de cloreto férrico/1% de ferricianeto de potássio (bandas de catalase aparecem como bandas de amarelo intenso). Tingimento de zimograma também foi complementado por ensaios de enzima nos filtrados de cultura, utilizando o método padrão publicado.

IMI393751 produz catalase extracelular ($M_r \sim 230$ kDa), com expressão diferencial sendo observada em um número de indutores de carbono (os números 1-18 representam indutores diferentes). Em contraste, nenhuma atividade extracelular foi observada para qualquer uma das outras cepas de *T. emersonii*, mesmo em amostras concentradas.

A presença dessas atividades de enzima nos filtrados de cultura de IMI393751 seria potencialmente importante ao afetar a estrutura do substrato, mas também para remover quaisquer compostos que podem oxidase atividades de hidrolase chaves, por exemplo, xilanase ou glucanase.

Exemplo 20

Comparação do fenótico de 10 cepas de *T. emersonii* em
mídia sólida (ágar) diferente

B. Mídia de ágar

- 5 1. Ágar de dextrose de Sabouraud (Oxoid Ltd., Reino Unido)
2. Ágar de maltose de batata (Oxoid Ltd., Reino Unido)
3. Czapek Dox (Oxoid Ltd., Reino Unido; pH não ajustado)
- 10 4. Ágar de farinha de milho (Oxoid Ltd., Reino Unido)
5. Ágar de extrato de malte (POxoid Ltd., Reino Unido)
- Emerson's Agar (amigo solúvel de potássio de levedura); YpSs)

Os ingredientes seguintes foram acrescentados a 1 L de
15 H₂O destilada:

- 15,0 g de amido solúvel (Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda)
- 4,0 g de extrato de levedura (Oxoid Ltd., Reino Unido)
- 1,0g de fosfato di-hidrogênio de potássio (KH₂PO₄)
- 20 0,5 g Heptahidrato de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O)
- 20,0 g Agar No. 1 (Oxoid Ltd., Reino Unido)

Pratos de ágar (cada tipo de ágar) foram inoculados com as 10 cepas diferentes de *T. emersonii*. Um lote de pratos foi incubado a 45°C e o segundo a 55°C (teor de
25 umidade do ar foi de ~20-30%). As culturas foram verificadas diariamente, e os resultados seguintes foram registrados:

- (a) medição do diâmetro da cultura (utilizando um calibre)
- 30 (b) registro fotográfico utilizando uma câmara digital

de 7,0 M pixel

(c) registro de mudanças/diferenças fenotípicas visíveis

(d) indicação de formação de esporos (análise
5 microscópica) ou não

Resultados

O cultivo de cepas de *T. emersonii* em diferentes mídias de ágar revelou diferenças claras entre a cepa 393751 e as outras 9 cepas com relação ao seguinte:

10 Tabelas 43 e 44

Resumo da velocidade e extensão do crescimento a 45°C - medições do diâmetro de cultura tomados no dia 2 e no dia 5.

15 **Tabela 45:** Velocidade de crescimento a 55°C - medições de diâmetro de cultura tomados no dia 5.

Tabela 46: Resumo das mudanças fenotípicas visíveis e evidência para a formação de esporos.

Observação Importante 1: muitas das cepas IMI/CBS produziram culturas multicoloridas. No entanto, a pureza
20 dessas culturas foi verificada. As cores/pigmentos produzidos e o padrão da produção é típico de muitas espécies de *Penicillium*, por exemplo, *P. pinophilum*.

Observação importante 2: Como é indicado na Tabela 20, existem diferenças claras entre a cepa 393751 e as demais
25 em termos de formação de esporos.

Tabela 43: taxa e extensão de crescimento em 45°C- diâmetro de cultura medidos no dia 5

Cepa	SDA	CMA	PMA	MEA	YpSs	YG	Nutr Agar	Czapek Dox	OMA
IMI 393751 (our strain)	+++++	+++++	++	+++++	++	+++++	++	+++++	+++++
IMI 393752 (CBS 549.92)	+++++	+++++	++	+++	++	+++++	++	+++	+++++
IMI 393753 (CBS 180.68)	+++	+++++	+	+++	+	+++++	++	+++	+++
IMI 393755 (CBS 355.92)	+++++	+++++	++	+++	+	+++++	+	++	+++++
IMI 393756 (CBS 393.64)	+++++	+++++	+++	+++	++	+++++	++	+++	+++
IMI 393757 (CBS 394.64)	+++	+++	+	+++	+	+++++	+	++	+
IMI 393758 (CBS 395.64)	+++++	+++++	++	+++	+	+++++	+++	++	+++++
IMI 393759 (CBS 397.64)	+++++	+++++	++	+++	++	+++++	++	+++	+++++
IMI 393760 (CBS 472.92)	+++++	+++++	+++++	+++++	++	+++++	++	+++	+++++
IMI 393761 (CBS 759.71)	+++++	+++++	nd	+++++	++	+++++	++	++	+++++

SDA, Sabouraud Dextrose Agar; CMA, Cornmeal Agar; PMA, Potato Maltose Agar; MEA, Malt Extract agar; YpSs, Yeast potassium soluble starch; YG, Yeast Glucose Agar; NA, Nutrient / OMA, Oatmeal Agar. Culture diameters: Full plate, +++++; 65-80 mm, ++++; 50-65 mm, ++++; 35-50 mm, ++; 20-35 mm, ++; and <20 mm, +.

Tabela 44: taxa e extensão de crescimento a 45°C - diâmetro de cultura medidos no dia 2

Cepa	SDA	CMA	PMA	MEA	YpSs	YG	Nutr Agar	Czapek Dox	OMA
IMI 393751 (our strain)	++++	++	+	++++	+	+++	+	+++	++++
IMI 393752 (CBS 549.92)	+++	+++	+	+	+	++	+	+	++
IMI 393753 (CBS 180.68)	++	++	-	+	+	++	+	+	+
IMI 393755 (CBS 353.92)	++	++	+	++	-	+	-	-	+
IMI 393756 (CBS 393.64)	++	+	+	+	+	++	-	+	
IMI 393757 (CBS 394.64)	+	+	-	++	-	+	-	+	
IMI 393758 (CBS 395.64)	++	++	+	+	-	+	+	+	++
IMI 393759 (CBS 397.64)	++	++	+	+	+	+	+	+	+
IMI 393760 (CBS 472.92)	++	++	++	++	+	++	-	+	+++
IMI 393761 (CBS 759.71)	++	++	nd	+	+/-	+	+/-	+	+

SDA, Sabouraud Dextrose Agar; CMA, Cornmeal Agar; PMA, Potato Maltose Agar; MEA, Malt Extract agar; YpSs, Yeast potassium soluble starch; YG, Yeast Glucose Agar; NA, Nutrient A OMA, Oatmeal Agar. Culture diameters: Full plate, +++++; 65-80 mm, ++++; 50-65 mm, ++++; 35-50 mm, +++; 20-35 mm, ++; and <20 mm, +; no evidence for growth, -.

Tabela 45: taxa e extensão de crescimento a 55°C - diâmetro de cultura medidos no dia 5

Cepa	SDA	CMA	PMA	MEA	YpSs	YG	Nutr Agar	Czapek Dya	OMA
IMI 393751 (our strain)	+++++	+++++	++	+++++	+++	+++++	++	+++++	+++++
IMI 393752 (CBS 549.92)	++	++	+	+	+	++	+	+	+++
IMI 393753 (CBS 180.68)	+	+	-	+	-	+	-	+	+
IMI 393755 (CBS 355.92)	+	++	+/-	+	-	+	-	-	++
IMI 393756 (CBS 393.64)	+	++	+	-	-	+	-	-	
IMI 393757 (CBS 394.64)	+	+	-	+	-	+	-	-	
IMI 393758 (CBS 395.64)	+++	+++	+	+++	+	++	+	+	+++
IMI 393759 (CBS 397.64)	+	-	-	-	-	++	-	+/-	+/-
IMI 393760 (CBS 472.92)	+	++	++	++	-	+/-	-	-	++
IMI 393761 (CBS 759.71)	+	-	-	+/-	-	+/-	-	-	+

SDA, Sabouraud Dextrose Agar; CMA, Cornmeal Agar; PMA, Potato Maltose Agar; MEA, Malt Extract agar; YpSs, Yeast potassium solub starch; YG, Yeast Glucose Agar; NA, Nutrient Agar; OMA, Oatmeal Agar. Culture diameters: Full plate, +++++; 65-80 mm, ++++; 50-65 mm, ++++; 35-50 mm, +++; 20-35 mm, ++; and <20 mm, +; no evidence for growth.

Tabela 46: Resumo de mudanças fenotípicas visíveis e evidência para formação de esporos (culturas de 5 dias de vida, 45°C)

Cepa	SDA	CMA	PMA	MEA	YpSs	YG	Natr Agar	Chapek Dox	OMA
IMI 393751 (our strain)	Very dense, creamy white fluffy growth; orange colour at centre	Light, translucent growth; dense growth at inoculation point	Buff coloured and fluffy appearance	White fluffy growth; buff colour at leading edge	Dark buff centre; white at leading edge dense growth	Dark buff centre; lighter buff at leading edge dense growth	Translucent growth; dark buff leading edge	Translucent growth; 'feathery' appearance	White and H centre
	X	some	X	X	X	X	X	X	Sim
IMI393752 (CBS 549.92)	White/cream; lime green; darker buff-green at centre	Pale translucent growth; green spores	Dense growth - Cream-buff centre and buff edges	Pale cream centre; Lime green	Pale cream-buff	Lime green; cream leading edge	Pale buff; slimy leading edge	Translucent growth; green centre	Dense growth; green; pinkish centre; cream leading edge
	Sim	Sim	X	Sim	Some	Sim	X	Sim	Sim
IMI393753 (CBS 180.68)	Fluffy white with green to deep buff centre	White cream translucent growth	Very dense growth; cream-buff	Dense growth; cream edge, yellow-green-pale orange centre	Cream-buff	Green edges; pale cream and green centre	Dense buff-cream; slimy leading edge	Translucent growth; light green centre	Pale cream leading edge; light green dark cream or
	Sim	Sim	Sim	Sim	Some	Some	X		Sim
IMI393755 (CBS 355.92)	Dark buff centre; cream leading edge	Buff translucent growth	Dense growth; cream-buff	Cream edges; lime green mid; orange centre	Buff-cream	Cream-dark buff centre	buff-cream; slimy leading edge	Very translucent growth; growth;	Buff or light buff buff or
	Sim	Sim	Sim	Sim	Some	Sim	Some	Some	Sim
IMI393756 (CBS 392.64)	Very dense growth; Cream-buff	Light, translucent growth	dark buff	Pale buff cream-light green-orange & cream centre	Buff, dense growth	Buff edges, green to darker green in centre	Buff-white	Very light & translucent growth	Cream at edge green-orange
	Sim	Some	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Some	Sim

SDA, Sabouraud Dextrose Agar; CMA, Cornmeal Agar; PMA, Potato Maltose Agar; MEA, Malt Extract agar; YpSs, Yeast potassium soluble starch; YG, Yeast Gluco Agar; NA, Nutrient Agar; OMA, Oatmeal Agar.

Tabela 46: continuação

IMI393757 (CBS 394.64)	Appearance	Green at edges; lime green-orange centre; Very dense growth;	translucent; light green	Dark buff; cream sporangia	Cruciform; pale green edges; orange-buff centre	Cream	Dense green- buff growth	Cream-buff; slimy appearance	Light; buff spots at edges	Pale green- edges; dark - centre
	Sporulation	Sim	Sim	Sim	Sim	Inconclusive	Sim	Some	Some	Sim
IMI393758 (CBS 395.64)	Appearance	Buff-white edges; darker centre	Poor growth; translucent; buff spores	Dense growth; cream-green	Dense, fluffy growth; buff-green	Buff-cream; very poor growth	Buff edges; green spores	buff-some white; slimy	Very light & translucent; very poor	Dense grow Cream-buff
	Sporulation	Sim	Sim	Sim	Yes (yellow)	Sim	Sim	Some	Inconclusive	Sim
IMI393759 (CBS 397.64)	Appearance	White edges, green - buff at centre	translucent; white spores	Dense buff	Cream edge; Green - orange centre	Poor growth; buff white centre	Green-buff edges; green- buff dense centre	Poor growth; Buff, slimy at edges	Very light & translucent; Pale buff	White edges yellow-green
	Sporulation	Sim	Sim	Inconclusive	Sim	Inconclusive	Sim	Inconclusive	Sim	Sim
IMI393760 (CBS 472.82)	Appearance	Dense ochre-buff- lime green centre	White; light growth	White	Pale edges; fluorescent green centre	Pale white-cream	Dense centre - deep green; buff edges	Buff, slimy appearance	translucent; some white spores	Trans- buff
	Sporulation	Sim	Sim	Sim	Sim	Some	Sim	Inconclusive	Some	Sim
IMI393761 (CBS 759.71)	Appearance	Dark buff edges; pale cream - lime green - ochre	Poor growth - pale green tinge	nd	White edges, yellow - deep ochre - dark buff centre	White to pale at edges	Dense cream- buff growth	Cream-buff, slimy appearance	Poor growth; white spores	Cream at ed; lime green b interior
	Sporulation	Sim	Sim	Sim	Sim	Inconclusive	Inconclusive	Inconclusive	Sim	Sim

SDA, Sabouraud Dextrose Agar; CMA, Cornmeal Agar; PMA, Potato Maltose Agar; MEA, Malt Extract agar; YpSs, Yeast potassium soluble starch; YG, Yeast Glucose Agar; N Nutrient Agar; OMA, Oatmeal Agar.

Exemplo 20:

Dejetos clínicos tem valor calorífico de aproximadamente 14GJ/tonne. Dessa maneira, contém aprox 50-55% de material rico em celulose, que possui um alta
5 capacidade de ligação com água e baixor valor calorífico comparado à plásticos presentes nos dejetos de rio. O tratamento da celulose rica em componentes deste dejeito usando coquetéis de enzima termostável da invenção, por exemplo coquetéis 5 e 8, podem diminuir o volume de dejetos
10 em até~73-81%, e converter a celulose presente (79-84% de conversão) e gerar ~2.25-2.61 GJ/tonne(valor de caloria). O resíduo, que foi enriquecido com plásticos poderia ter sido usado como derivado de combustível comum potencial calorífico de até 34-38 GJ/tonne.

15 Fração de dejetos sólidos municipais

A fração orgânica de dejetos sólidos municipais tam valor calorífico de ~9,2-10,2 GJ/tonne. Desta forma, ele contém ~50-65% de material rico em carboidratos (principalmente de dejetos de comida e papel), o qual
20 possui alta capacidade de ligar com água e baixo valor xcalorífico comparadp com outros componentes, por exemplo poliestireno, plásticos e borracha presentes em dejetos.O tratamento do componente rico em celulose deste dejeito com os coquetéis de enzima termostável da invenção pode reduzir
25 o volume de dejeito em aproximadamente 50-70%, e converter o carboidrato presente (71-91% de conversão). O resíduo, que foi enriquecido em componentes não-biodegradáveis (ex: poliestireno, plásticos e borracha), pode ser usado como derivado combustível com potencial calorífico de até 26-38
30 GJ/tonne.

É ainda possível tratar dejetos municipais e outras formas de dejetos para incineração. Tratando tais matérias primas poderia reduzir, aumentar ou alterar seus valores caloríficos. Assim o tratamento produz um líquido de açúcares mistos que pode ser coletado ou removido sendo possível reduzir o valor calorífico. A Alteração no valor calorífico poderia facilitar a incineração desses materiais: por exemplo reduzindo o valor calorífico para um nível facilitaria o controle do processo de incineração; aumentar o valor calorífico significa que a quantidade de energia requerida para incineração é reduzida. Por exemplo, convertendo a celulose presente em dejetos clínicos ricos em celulose para separar açúcares e recuperação destes reduziria significativamente o valor calorífico de dejetos - o resíduo ainda teria valor calorífico, mas seria muito menor (e dependeria muito mais da lignina presente).

Assim, em um outro aspecto da invenção provê um método de alterar o valor calorífico de um rio de dejetos tratando este com uma cepa *Talaromyces emersonii* da invenção ou uma composição enzimática da invenção.

Referências

1. Raeder U. e Broda P. (1985), Lett. Appl. Microbiol. Vol. 1 pgs 17-20.
2. P. Chomczynski e N. Sacchi (1987), Anal. Biochem Vol. 162, 156-159.
3. J. Sambrook, E.F. Fritsch e T. Maniatis (1989), "Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
4. G. Zaide, D. Shallom, S. Shulami, G. Zolotnitsky, G. Golan, T. Baasov, G. Shoham e Y. Shoham (2001) Eur. J. Biochem. Vol. 268, 3006-1010.

5. P. G. Murray, C. M. Collins, A. Grassick e M.G. Tuohy (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol 301, 280-286.
6. A. J. Harvey, M. Hrmova, R. De Gori, J.N. Varghese e G. B. Funcher, (2000) *Proteins* Vol. 41, 257-269.
7. A.P. Moloney, T. J. Hackett, P. J. Considine, M. P. Coughlan, (1983) *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 5, 260-264.
8. G. L. Miller (1951), *Anal. Chem.* Vol 31, 426-428.
9. M. Dubois, K. Gilles, P. A. Hamillton, P. A. Rebers, F. Smith, (1956) *Anal. Chem.* 28, 350-356.
10. U. R. Laemmli, (1970), *Nature (London)*, Vol. 227, 680-685.
11. P. G. Murray, A. Grassick, C. D. Laffey, M.; M. Cuffe, T. Higgins, A. V. Savage, A. Planas, M. G. Tuohy, (2001), *Enzyme Microbial Technol.* Vol. 29, 90-98.
12. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951), *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
13. L. Falquet, M.Pagni, P. Bucher, N. Hulo, C. J. Sigrist, K. Hofmann, A. Bairoch, (2002), *Nucleic Acids Research*, Vol. 30, 235-238.
14. H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, G. von Heijne, (1997), *Int. J. Neural Syst.*, Vol. 8, 581-599.
15. D.Higgins, J. Thompson, T. Gibson (1994): *Nucleic Acids Res*, Vol. 22. 4673-4680.
16. A. C. Stolk, R. A. Ramson (1972) *Studies in Mycology* No. 2, pp.1-65.
17. Tuohy M. G., Coughlan, M. P. (1992) *Bioresource Technol.* 39, 131-137.
18. Tuohy M. G., Walsh, D. J. Murray, P. G., Claeyssens, M. Cuffe, M. M., Savage, A. V., Coughlan, M. P.

(2002). *Biochim. Biophys. Acta*, 336-380.

19. Reynolds, P. J. (1986) Tese de Ph.D., National University of Ireland, Galway.

20. APHA, A., WEF. (1992) Standard methods for the
5 examination of wastewater.

21. Walsh, D. J. (1997) Tese de Ph. D., National University of Ireland, Galway.

22. Gilleran, C. T. (2004) Tese de Ph. D, National University of Ireland, Galway.

10 23. Maloney, A. P., Callan, S. M., Murray, P. G., Tuohy, M. G. (2004) *Eur. J. Biochem.* 271, 3115-3126.

24. Braet, C. (2005) Tese de Ph. D, National University of Ireland, Galway.

Bensadoun, A. e Weinstein, D. (1976). *Anal. Biochem.*
15 70: 241-250.

25. Tuohy, M. G., Laffey, C. D. & Coughlan, M. P. (1994) *Bioresource Technol.* 50, 37-42.

Tuohy, M. G., Puls, J. Claeysens, M. M. Vrsanska, M. & Coughlan, M.P. (1993). *Biochem. J.* 290, 515-523.

20 26. Murray, P. G., Aro, N., Collins, C., Grassick, A., Penttilä, M. Saloheimo, M. & Tuohy, M. 2004. *Prot. Expre. Purif.* Vol. 38, pp. 248-257.

27. McCarthy, T., Hanniffy, O., Lalor, E., Savage, A. V. & Tuohy, M. G. 2005. *Process Biochem.* Vol. 40, pp. 1741-
25 1748.

28. McCarthy, T., Hanniffy, O., Savage, A.V. & Tuohy, M. G. (2003) *Int. J. Biol. Macrmol.* 33: 141-148.

29. Colleran, E. & Pistilli, A. (1993) *Ann. Microbiol. Enzimo.* 44: 1-18.

30 30. Coates, J. D., Coughlan, M. F. & Colleran, E.

(1996) J. Microbiol. Meth. 26: 237-246.

REIVINDICAÇÕES

1. Cepa termofílica de *Talaromyces emersonii*, caracterizada por possuir uma faixa de temperatura de crescimento de 30 a 90°C e que secreta ativamente enzimas a
5 temperaturas acima de 55°C.

2. Cepa de *Talaromyces emersonii*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de incluir a deposição número IMI393751 ou um mutante deste também codificar enzimas termo-estáveis.

10 3. Enzima produzida por uma cepa, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de reter atividade a temperaturas acima de 55°C.

4. Enzima, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de ser selecionada do grupo que
15 consiste de enzimas modificadoras de carboidratos, enzimas proteolíticas, oxidases e oxidoreductases.

5. Composição de enzima caracterizada pelo fato de compreender uma celobiohidrolase I ou uma celobiohidrolase II o uma mistura destas, uma β -glucosidase 1, uma xilanase,
20 e uma endo- β -(1,3)4-glucanase.

6. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de a enzima ser uma enzima conforme a reivindicação 3.

7. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação
25 5 ou 6, caracterizada pelo fato de a composição compreender 0,5 a 90% de celobiohidrolase I ou uma celobiohidrolase II ou uma mistura destas, 0,1 a 33% de β -glucosidase 1, 0,6 a 89% de xilanase e 0,4 a 68% de endo- β -(1,3)4-glucanase.

8. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma
30 das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de

compreender CBH I (10-30%), CBH II (10-15%), β -(1,3)4-glucanase (20-45%), β -glucosidase (2-15%), e Xilanase (18-55%).

9. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: β -xilosidase, α -glucuronidase, exoxilanase, α -L-arabinofuranosidase, enzimas pectinolíticas, hemicelulases, enzimas modificadoras de amido, oxidoreductase/oxidase e esterases; e proteases.

10. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: β -Xilosidase (0,1-20%), α -glucuronidase (0,1-10%), exoxilanase (1-15%), α -L-Arabinofuranosidase, (0,1-5,0%), enzimas pectinolíticas (2-25%), hemicelulases (5-10%), enzimas modificadoras de amido (5-10%), oxidoreductase/oxidase e esterases (1-10%); e protease (7-25%).

11. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 9 ou 10 ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de incluir a bioconversão de materiais de planta ou derivados de plantas ou fluxos de dejetos que incluem dejetos hospitalares.

12. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (1-25%), CBH II (1-28%), β (1,3)4-glucanase (18-40%), β -glucosidase (2-30%), Xilanase (15-55%), e β -Xilosidase (0,7-20%).

13. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de compreender um

ou mais dos seguintes: α -glucuronidase (1-10%), α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5,0%), exoxilanase (1-15%), enzimas pectinolíticas (5-25%), atividade modificadora de amido (2-12%), hemicelulases (2-11%),
5 oxidoreductases/oxidase e esterases (1-15%), e protease (2-15%).

14. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, ou uma cepa de microorganismo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo
10 fato de incluir a produção de matérias primas ricas em monossacarídeos de resíduos de plantas.

15. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (12-55%), CBH II (15-30%), β (1,3)4-
15 glucanase (12-26%), β -glucosidase (5-12%), Xilanase (5-30%), β -Xilosidase (0,1-10%) e α -L-Arabinofuranosidase (0,5-3,0%).

16. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de ainda
20 compreender um ou mais do seguinte: α -glucuronidase (5-15%); outras hidrolases incluindo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilan)esterases, Protease e atividades de oxidase modificadoras de lignina, proteases e oxidases.

25 17. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir o processamento e a reciclagem de madeira, produtos de papel e papel.

30 18. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma

das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (15-30%), CBH II (10-40%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (15,40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanase (15-30%), e β -Xilosidase (1-8%).

5 19. Composição de enzima , de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais dos seguintes: Exoxilanase; α -Glucuronidase; α -L-Arabinofuranosidase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases,
10 ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease.

15 20. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, ou uma cepa de microorganismo , de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir processamento e reciclagem de produtos têxteis.

20 21. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (5-55%), CBH II (8-50%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (10-30%), β -glucosidase (0,5-30%), Xilanase (5-30%), e β -Xilosidase (0,1-10%).

25 22. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -L-Arabinofuranosidase; α -glucuronidase; outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas selecionadas, esterases; protease; e oxidases.

30 23. Utilização de uma composição de enzima, de acordo

com a reivindicação 21 ou 22, ou uma cepa de microorganismo , de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir a sacarificação de dejetos de papel.

24. Composição de enzima , de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (2-10%), CBH II (2-10%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (10-45%), β -glucosidase (5-10%), e Xilanase (1-30%).

25. Composição de enzima , de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: N-Acetilglucosaminidase; quitinase; $\beta(1,3)$ 6-glucanase; β -Xilosidase; α -Glucuronidase; α -L-Arabinofuranosidase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases, oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease.

26. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 24 ou 25, ou uma cepa de microorganismo , de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir controle antifungal, biocontrole e controle de lama.

27. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (1-20%), CBH II (1-28%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (15-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanase (18-55%), β -Xilosidase (0,1-10%) e α -L-Arabinofuranosidase (0,5-5,0%)

28. Composição de enzima, de acordo com a

reivindicação 27, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e
5 esterases; protease; exoxilanase; outras hidrolases, incluindo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico e acetil(xilan)esterases; protease; e atividades de oxidase modificadora de lignina.

29. Utilização de uma composição de enzima, de acordo
10 com a reivindicação 27 ou 28, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir aplicações hortícolas.

30. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de
15 compreender CBH I (5-30%), CBH II (1-15%), β (1,3)4-glucanase (10-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanase (18-48%), β -Xilosidase (0,1-20%), α -Glucuronidase (1-10%), e α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5,0%).

31. Composição de enzima, de acordo com a
20 reivindicação 30, caracterizada pelo fato de compreender um ou mais do seguinte: Exoxilanase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases,
25 incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease.

32. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 31, ou 32, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2,
30 caracterizada pelo fato de incluir a produção de

alimentação animal para aprimorar a digestibilidade de alimentos com base em cereal.

33. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (0,5-10%), CBH II (0,5-10%), β (1,3)4-glucanase (15-43%), β -glucosidase (2-10%), Xilanase (30-88%), Xilosidase (0,1-2,0%), α -Glucuronidase (0,1-3,0%), α -L-arabinofuranosidase.

34. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 33, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir a produção de alimentos com base em cereais contendo baixa pentose para animais monogástricos com digestibilidade aprimorada e baixo teor de β -glucan não-celulósico.

36. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: exoxilanase, enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases, oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease.

38. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 36 ou 37, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir a produção de alimentos funcionais com potencial bioativo para utilização na saúde veterinária.

39. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de

compreender CBH I (1-15%), CBH II (1-15%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (10-45%), α -glucosidase (2-10%), Xilanase (1-55%), Xilosidase (0,5-12%).

40. Composição de enzima , de acordo com a
5 reivindicação 39, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase, α -L-Arabinofuranosidase; $\beta(1,3)$ 6-glucanase; N-acetilglucosaminidase; chitinase, enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase,
10 poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; protease.

41. Utilização de uma composição de enzima, de acordo
15 com a reivindicação 40 ou 41, ou uma cepa de microorganismo , de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir a produção de produtos especializados lácteos ou dietéticos, por exemplo, alimentos, e formulações de bebidas para o cuidado da saúde geriátrica e
20 de infantes.

42. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (1-10%), CBH II (5-15%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (15-40%), α -glucosidase (2-30%), Xilanase (15-
25 55%), β -Xilosidase (1-12%), α -glucuronidase (1-8%), e α -L-Arabinofuranosidase (0,5-5,0%).

43. Composição de enzima , de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: enzimas pectinolíticas,
30 incluindo galactosidases, ramnogalacturonase,

poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; protease.

5 44. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 42 ou 43, ou uma cepa de microorganismo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir os setores de padaria e confeitaria, e na formulação de produtos de padaria de alimentos de saúde
10 novéis.

 45. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (1-20%), CBH II (1-40%), $\beta(1,3)6$ -glucanase; N-acetilglucosaminidase; chitinase; α -
15 glucuronidase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; oxidoreductase/oxidase e esterases; protease.

 47. Utilização de uma composição de enzima, de acordo
20 com a reivindicação 45 ou 46, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir a geração de compostos precursores de sabor, de aroma e sensórios na indústria de alimentos.

 48. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma
25 das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (1-15%), CBH II (1-15%), $\beta(1,3)4$ -glucanase (10-45%), β 0glucosidase (2-30%), Xilanase (1-55%), β -Xilosidase (0,5-12%).

 49. Composição de enzima, de acordo com a
30 reivindicação 48, caracterizada pelo fato de ainda

compreender um ou mais do seguinte: α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5,0%); β (1,3)6-glucanase; N-acetilglucosaminidase; chitinase; α -Glucuronidase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; outras hemicelulases, incluindo galactosidases; oxidoreductase/oxidase e esterases; e protease.

50. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 48 ou 49, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir a geração de alimentos funcionais.

51. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (1-15%), CBH II (1-15%), β (1,3)4-glucanase (10-45%), β -glucosidase (1-15%), Xilanase (1-30%), β -Xilosidase (0,5-20%).

52. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5%); β (1,3)6-glucanase; N-Acetilglucosaminidase; chitinase; α -Glucuronidase; enzimas pectinolíticas, incluindo galactosidases, ramnogalacturonase, poligalacturonase, exogalacturonase e galactanase; atividade modificadora de amido; oxidoreductase/oxidase e esterases; protease.

53. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 51 ou 52, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de incluir a produção de bebidas alcoólicas e não-

alcoólicas novéis de projetistas, sucos de frutas e bebidas para a saúde.

54. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de
5 compreender CBH I (3-15%), CBH II (3-15%), $\beta(1,3)4$ -glucanase (15-40%), β -glucosidase (1-15%), Xilanase (16-55), e β -Xilosidase (0,5-7%).

55. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de ainda
10 compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,5-4%), α -L-Arabinofuranosidase (1-5%), exoxilanase (2-10%), enzimas pectinolíticas (5-25%), atividade modificadora de amido (2-8%), hemicelulases (5-10%), oxidoreductases/oxidase e esterases (1-10%), e protease (5-
15 15%).

56. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 54 ou 55, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreender a produção de produtos biofarmacêuticos
20 como oligossacarídeos bioativos (incluindo (1,3(4 e (1,3)6-glucooligossacarídeos de enlace misto, galactooligossacarídeos, xiloglucooligossacarídeos, oligossacarídeos pécnicos, xilooligossacarídeos ramificados e lineares, (galacto)glucomanoligossacarídeos,
25 glicopeptídeos e glicosídeos flavonóides de plantas terrestres e marinhas, resíduos de plantas, fungos e fluxos de dejetos ou sub-produtos ricos em açúcares simples.

57. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de
30 compreender CBH I (1-20%), CBH II (1-40%), $\beta(1,3)4$ -

glucanase (15-45%), β -glucosidase (2-12%), Xilanase (1-35%), e β -Xilosidase (1-5%).

58. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de ainda
5 compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,5-10%), α -L-Arabinofuranosidase (1-5%), exoxilanase (1-10%), enzimas pectinolíticas (5-25%), atividade modificadora de amido (2-15%), hemicelulases (5-10%), oxidoreductases/oxidase e esterases (1-15%) e protease (5-
10 15%).

59. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 57 ou 58, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreender aumentar a biodisponibilidade de
15 biomoléculas com atividade anti-bactericida e anti-viral natural, incluindo glicosídeos flavonóides e cianogênicos, saponinas, oligossacarídeos e fenólicos (incluindo ácidos ferúlicos e p-coumáricos, epicatequina, catequina, ácido pirogálico e assemelhados).

20 60. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (3-15%), CBH II (3-15%), β (1,3)4-glucanase (25-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanase (10-30%), e β -Xilosidase (0,5-8%).

25 61. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 60, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,5-10%), α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5%), exoxilanase (1,5%), enzimas pectinolíticas (2-15%), atividade modificadora de
30 amido (2-7%), hemicelulases (5-10%),

oxidoreductases/oxidase e esterases (1-10%) e protease (5-15%).

62. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 60 ou 61, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreender aumentar a biodisponibilidade de biomoléculas antioxidantes naturais, por exemplo, carotenóides, licopenes, xantofils, antocianinas, fenólicos e glicosides de todos os materiais de plantas, resíduos, dejetos, incluindo várias frutas e morangos.

63. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (1-25%), CBH II (1-40%), $\beta(1,3)4$ -glucanase (15-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanase (18-35%), e β -Xilosidase (0,5-12%).

64. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,5-10%), α -L-Arabinofuranosidase (0,5-5%), enzimas pectinolíticas (5-25%), atividade modificadora de amido (2-12%), hemicelulases (2-10%), oxidoreductases/oxidase e esterases (1-15%), e protease (3-15%).

65. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 63 ou 64, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreender a geração de matérias primas de materiais de plantas cruas, resíduos de plantas e dejetos para uso na produção microbiana de antibióticos por fungos e bactéria, incluindo *Penicillium sp.* e *Streptomyces sp.*

66. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBY I (1-30%), CBH II (1-40%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (15-40%), β -glucosidase (2-15%), Xilanase (18-35%), e β -Xilosidase (0,5-8%).

67. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,5-10%), α -L-Arabinofuranosidase (1-5%), enzimas pectinolíticas (5-25%), atividade modificadora de amido (5-12%), hemicelulases (3-10%), oxidoreductases/oxidase e esterases (1-15%), exoxilanase (1-12%) e protease (5-15%).

68. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 66 ou 67, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreendera geração de matérias primas de materiais de plantas cruas, resíduos de plantas e dejetos para uso na produção microbial de ácido cítrico.

69. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (0,4-15%), CBH II (0,4-15%), $\beta(1,3)$ 4-glucanase (7-45%), β -glucosidase (2-25%), Xilanase (1-78%), e β -Xilosidase (0,4-8%).

70. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,5-4%), α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5%), enzimas pectinolíticas (2-25%), atividade modificadora de amido (2-15%), hemicelulases (2-10%), oxidoreductases/oxidase e esterases (1-15%), exoxilanase (2-12%) e protease (5-30%).

71. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 69 ou 70, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreender a produção de oligossacarídeos de polissacarídeos algais (por exemplo, laminaran e fucoidan) e aditivos derivados de extratos de plantas, por processos geralmente considerados como seguros, na formulação de cosméticos.

72. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (0,4-30%), CBH II (0,4-10%), $\beta(1,3)4$ -glucanase (7-45%), β -glucosidase (2-12%), Xilanase (1-78%), e β -Xilosidase (0,1-8%).

73. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,1-2%), α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5%), enzimas pectinolíticas (2-10%), atividade modificadora de amido (2-15%), hemicelulases (2-10%), oxidoreductases/oxidase e esterases (1-10%), exoxilanase (2-5%), e protease (8-15%).

74. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,1-2%), α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5%), enzimas pectinolíticas (2-10%), atividade modificadora de amido (2-15%), hemicelulases (2-10%), oxidoreductases/oxidase e esterases (1-10%), exoxilanase (2-5%) e protease (8-15%).

74. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,1-

2%), α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5%), enzimas pectinolíticas (2-10%), atividade modificadora de amido (2-15%), hemicelulases (2-10%), oxidoreductases/oxidase e esterases (1-10%), exoxilanase (2-5%), e protease (8-15%).

5 74. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 72 ou 73, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreender a produção de oligossacarídeos e glicopeptídeos para uso reagentes de
10 pesquisa, na produção de biossensores e como ferramentas na glicômica funcional para sondar interações receptor-ligante e na produção de bibliotecas de substrato para fazer perfis com especificidade de enzima-substrato.

15 75. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 72 ou 73, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreender a produção de oligossacarídeos e glicopeptídeos para uso como reagentes de pesquisa, na produção de biossensores e como ferramentas na glicômica
20 funcional para sondar interações receptor-ligante e na produção de bibliotecas de substratos para fazer o perfil da especificidade enzima-substrato.

25 75. Composição de enzima, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, caracterizada pelo fato de compreender CBH I (0,4-15%), CBH II (0,4-30%), β (1,3)4-glucanase (7-45%), β -glucosidase (1-12%), Xilanase (10-78%), e β -Xilosidase (0,4-8%).

30 76. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 75, caracterizada pelo fato de ainda compreender um ou mais do seguinte: α -Glucuronidase (0,5-

10%), α -L-Arabinofuranosidase (0,1-5%), enzimas pectinolíticas (2-15%), atividade modificadora de amido (2-8%), hemicelulases (5-10%), oxidoreductases/oxidase e esterases (1-10%), e protease (5-15%).

5 77. Utilização de uma composição de enzima, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, ou uma cepa de microorganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreender a produção de celulose modificada e β -glucans, celooligossacarídeos, 10 amidos modificados e maltooligossacarídeos, lactulose e polióis (por exemplo, manitol, gluciton ou dulcitol, xilitol, arabitól).

78. Utilização de um substrato produzido pelos métodos, de acordo com quaisquer uma das reivindicações 11, 15 14, 17, 20, 23, 26, 29, 33, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 68, 71, 74, ou 77 caracterizado por ser usado como matéria prima na produção de bicom bustível.

79. Bioetanol ou biogás caracterizado pelo fato de que sempre que produzido por um processo, este será de acordo 20 com a reivindicação 78.

80. Método para obter um sistema de enzima adequado para converter um substrato alvo, o método caracterizado pelo fato de compreender:

obter uma amostra do substrato alvo;

25 permitir que um inóculo de uma cepa de microorganismo cresça no substrato alvo e secrete enzimas;

recuperar as enzimas secretadas durante o crescimento no substrato alvo;

determinar atividades de enzimas e propriedades da 30 enzima;

construir um perfil de expressão de gene;
identificar proteínas da enzima e construir um perfil
de expressão de proteína;
comparar a expressão de gene com o perfil de expressão
5 de proteína; e
purificar as enzimas.

82. Método, de acordo com a reivindicação 55,
caracterizado pelo fato de ainda compreender:

10 analisar as enzimas; e
projetar o sistema de enzima.

82. Xilanase tendo um peso molecular de 17,5 kDa, um
pH ótimo de 4-4,5, reter 91% da atividade no pH 3,0, e ter
atividade de degradação contra tanto D-xilanos de enlace
misto como D-glucans de enlace misto.

15 83. Xilanase, de acordo com a reivindicação 82,
caracterizada pelo fato de também ter atividade contra
aril- β -xilosides.

84. Xilanase, de acordo com a reivindicação 82 ou a
reivindicação 83, caracterizado pelo fato de ser derivada
20 da cepa de *Talaromyces emersonii* com o número de deposição
IMI393751, ou uma cepa substancialmente similar a ela ou um
mutante da mesma.

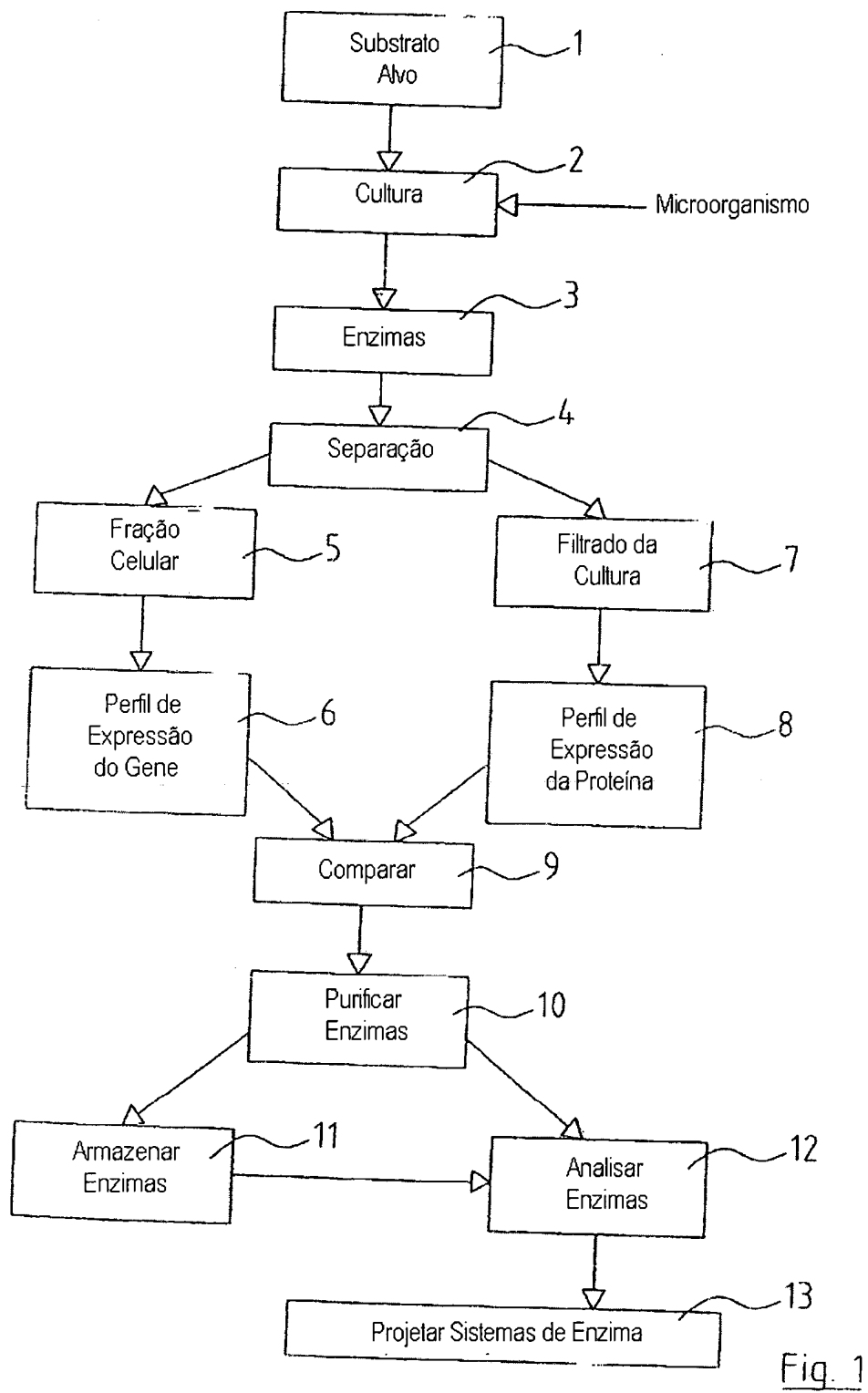


Fig. 1

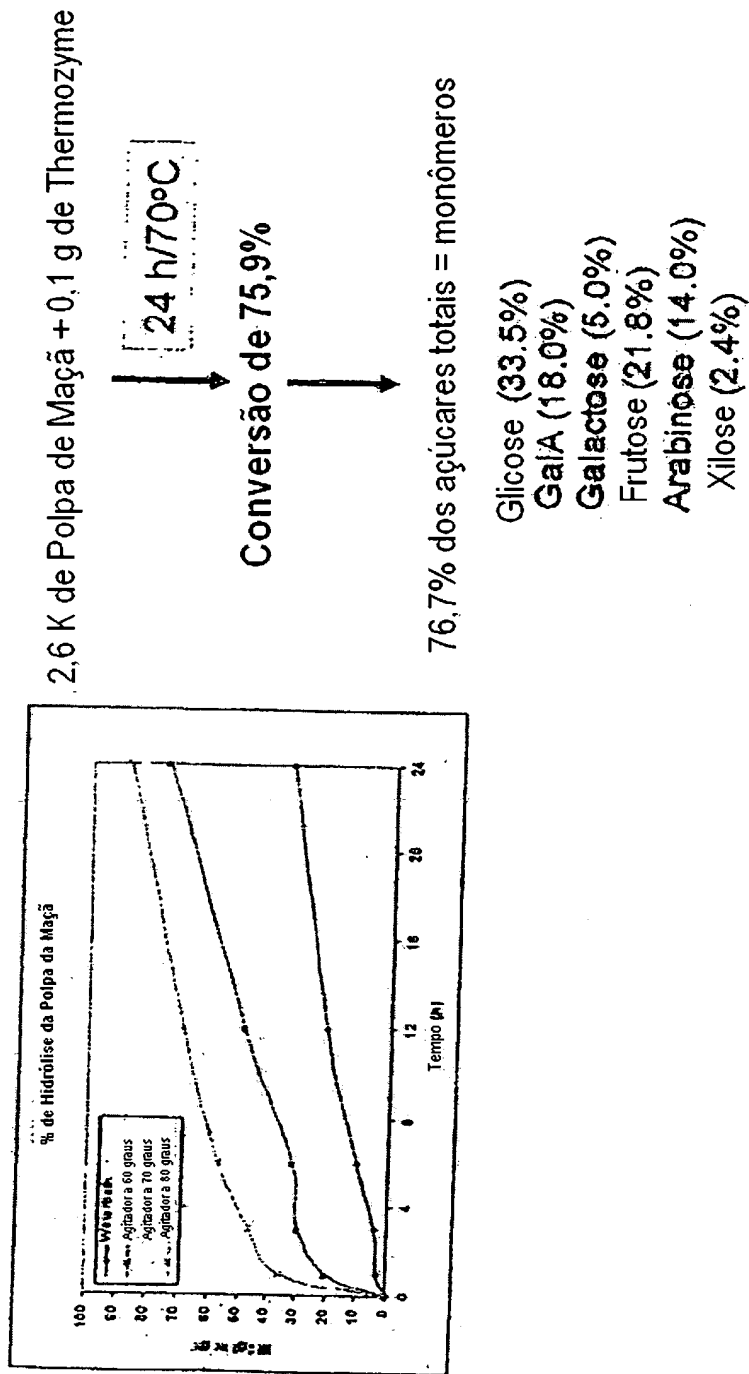
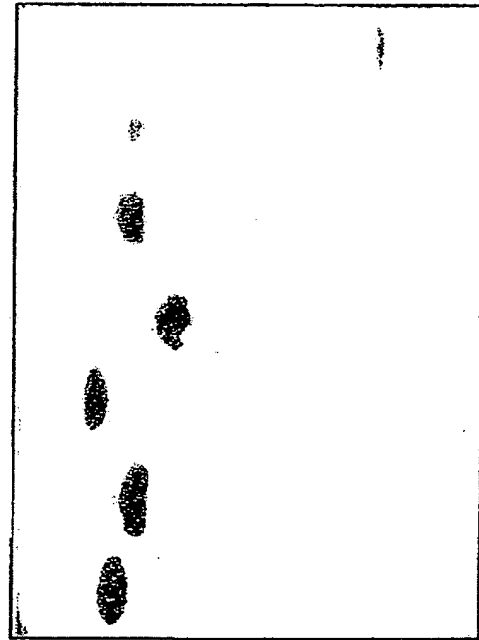
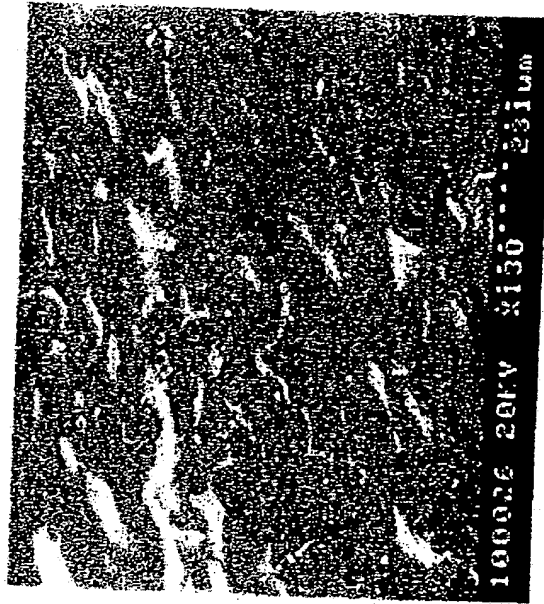


Fig. 2

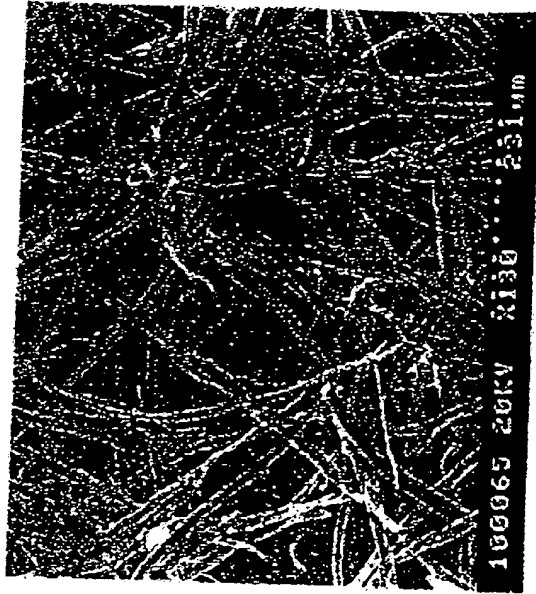


S_1 S_2 S_3 S_4 S_5 T_1 T_2

Fig. 3

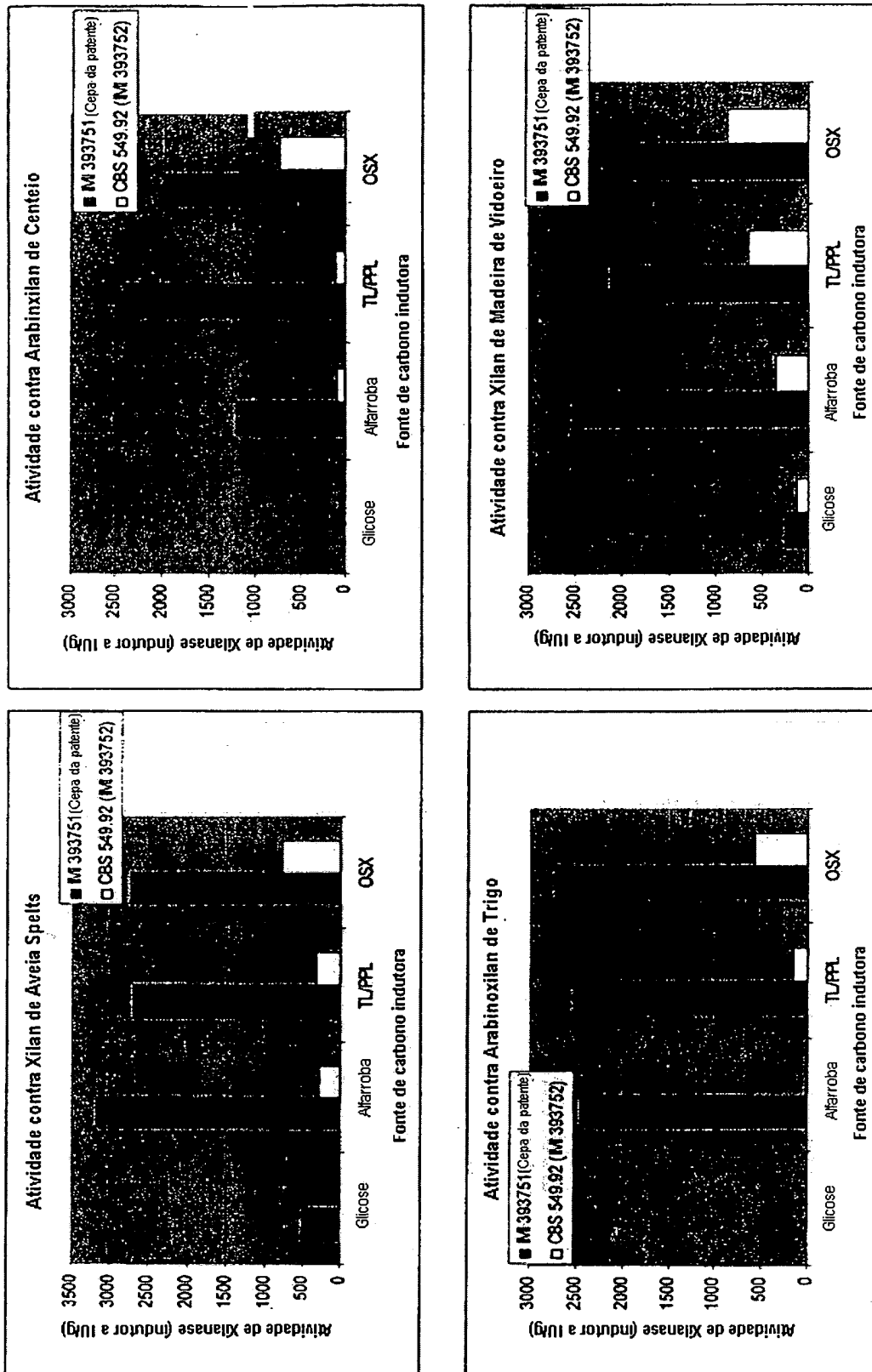


Tempo = 0h

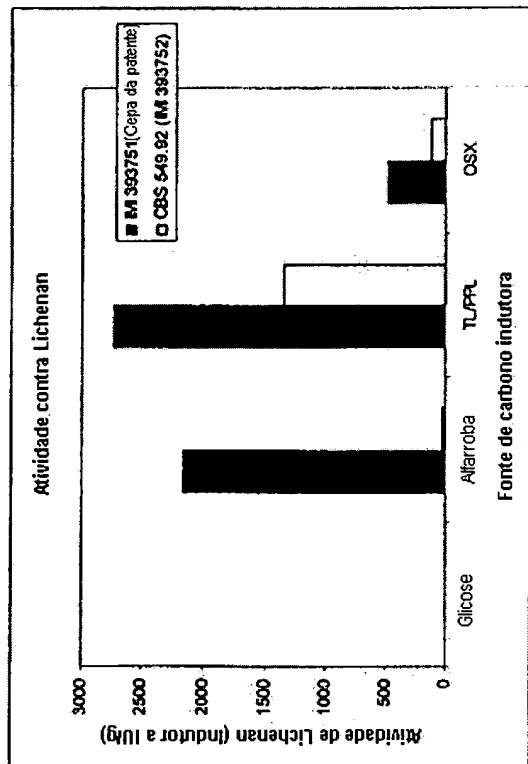
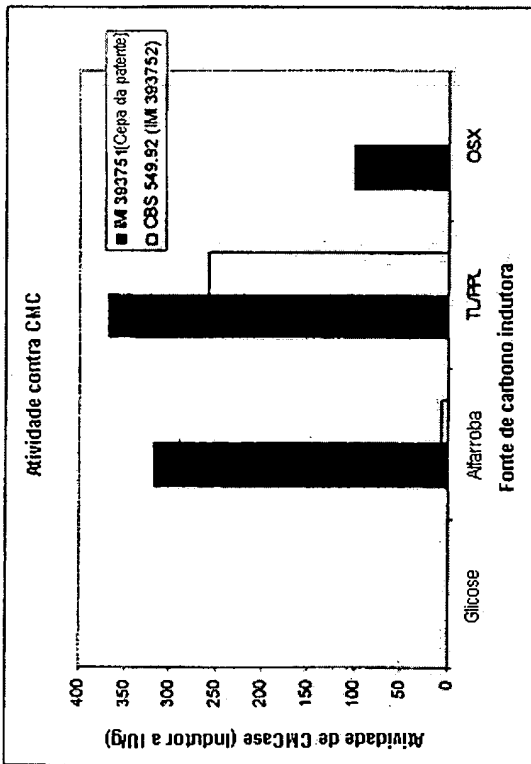
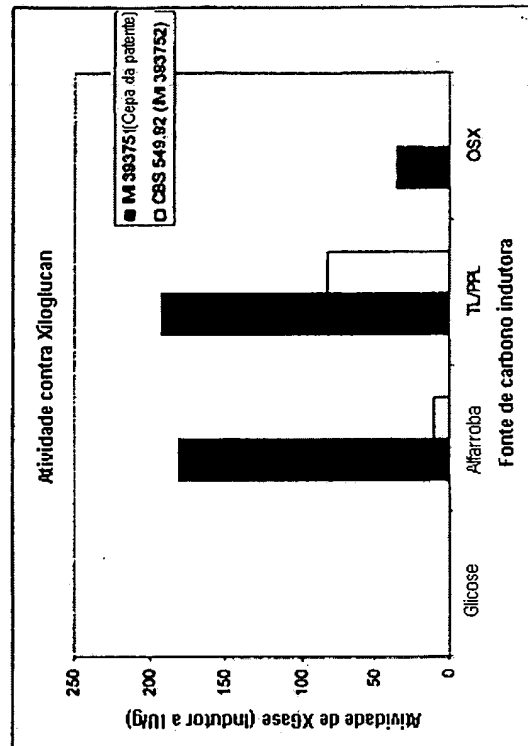
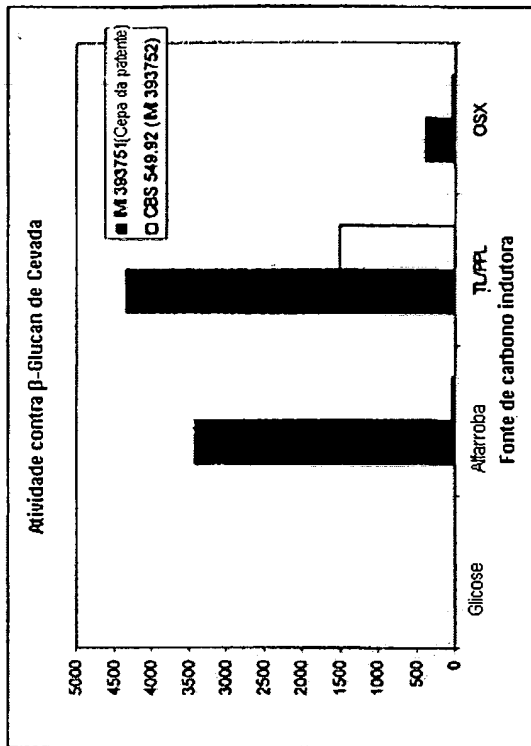


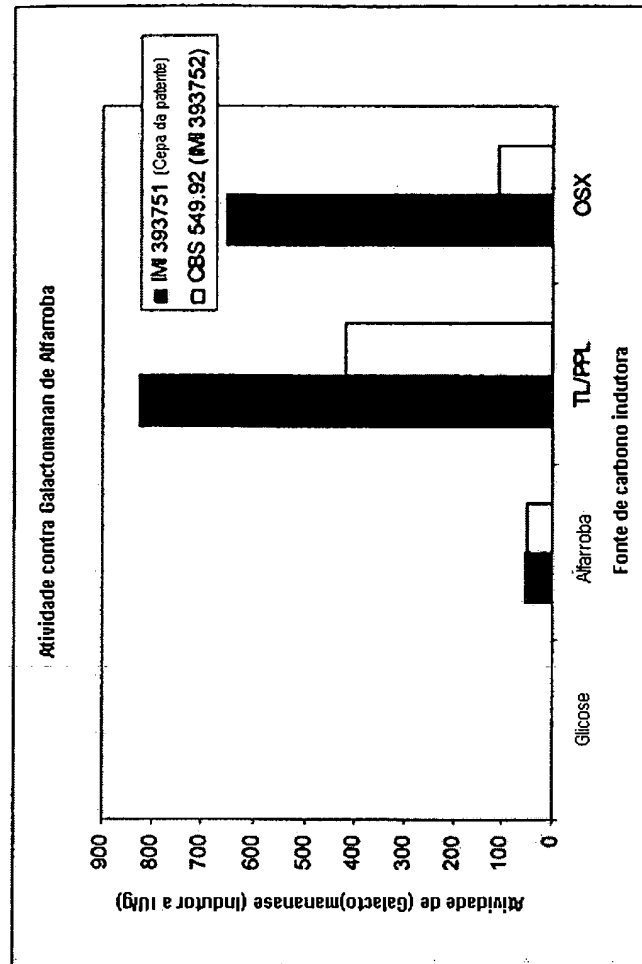
Tempo = 24h

Fig. 4



Figuras 5A-D





Figuras 6A-E

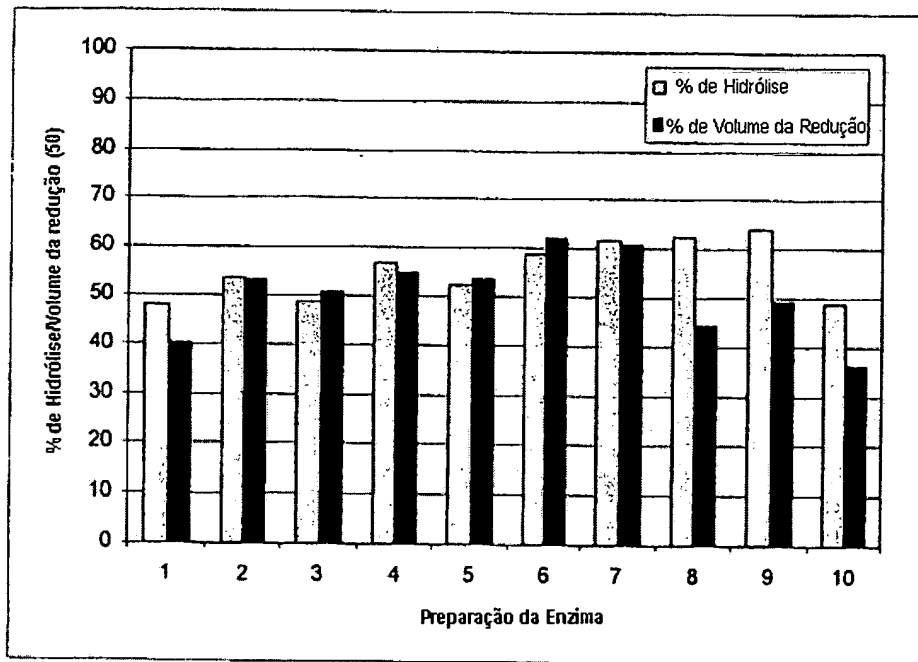


Figura 7

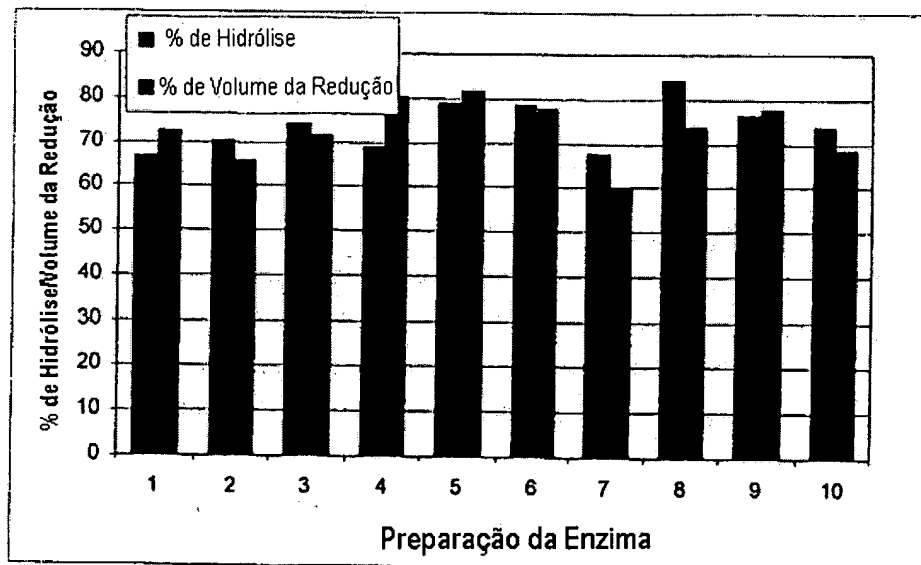


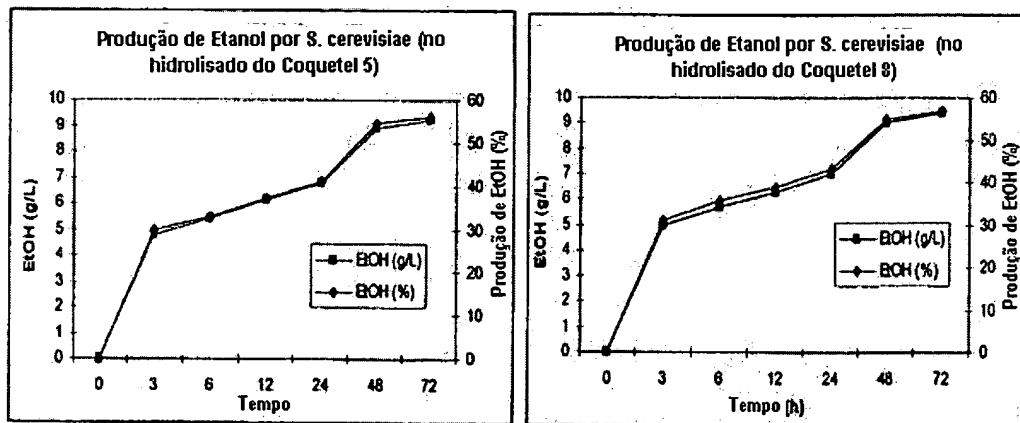
Figura 8



Figura 9A-B:

A

B



Figuras 10A-B:

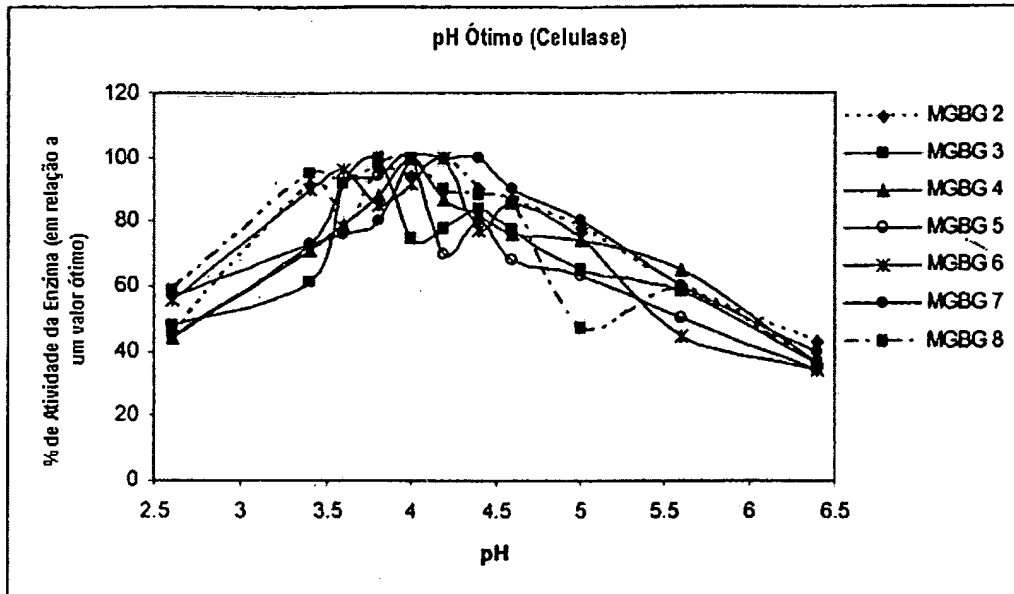


Figura 11A

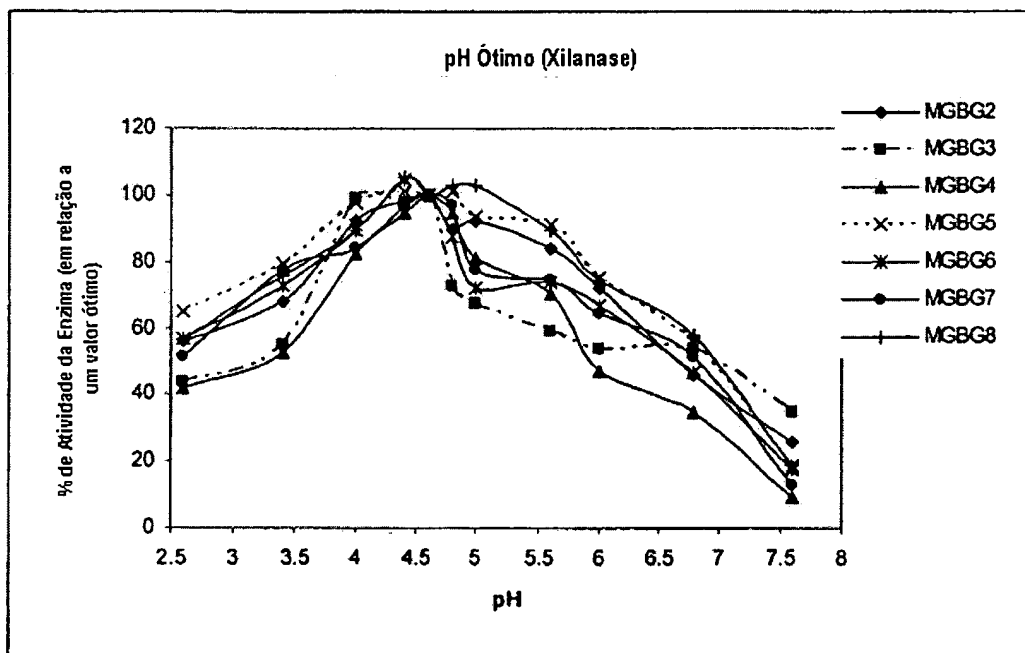


Figura 11B

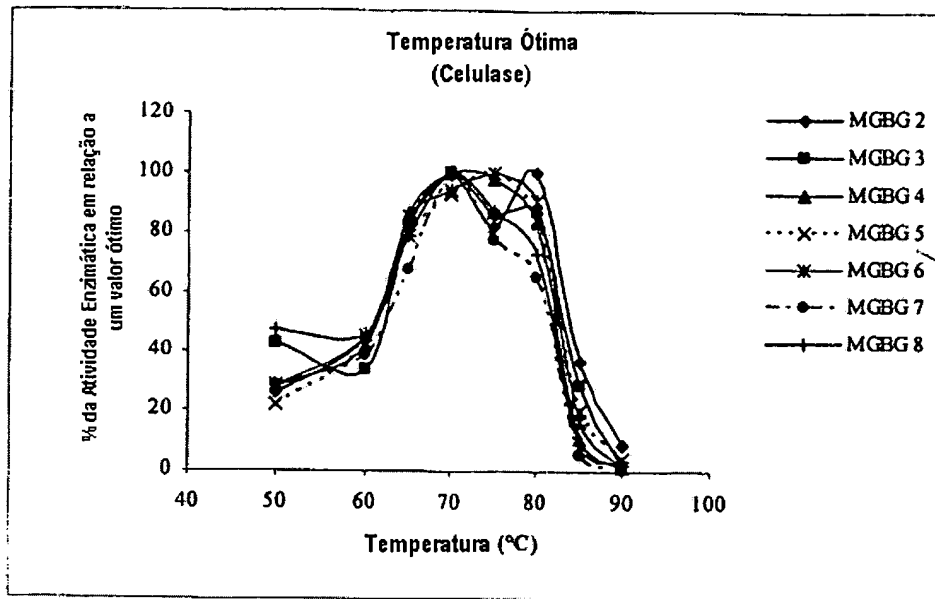


Figura 12

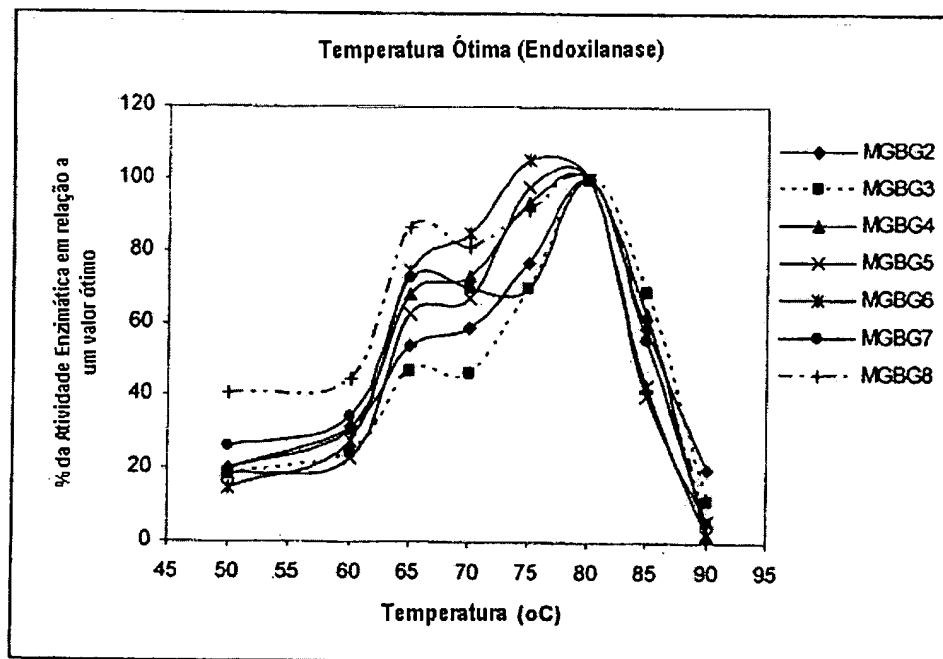


Figura 13

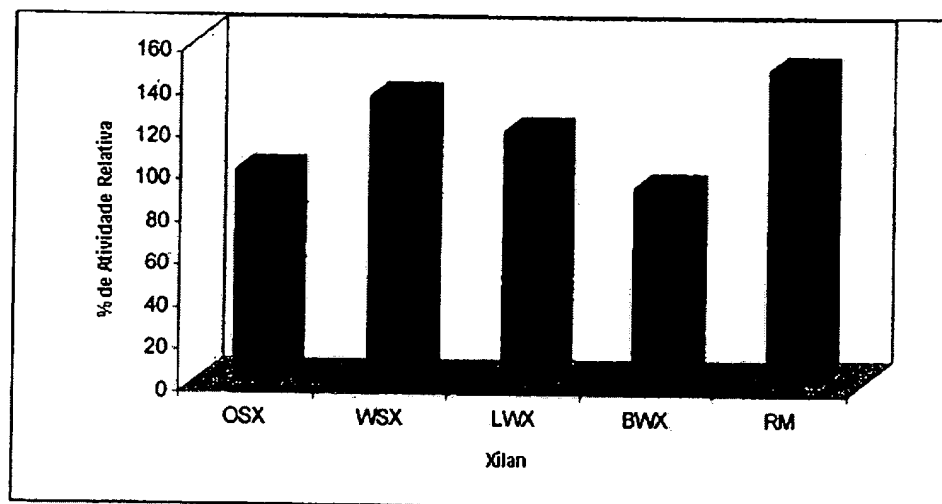


Figura 14

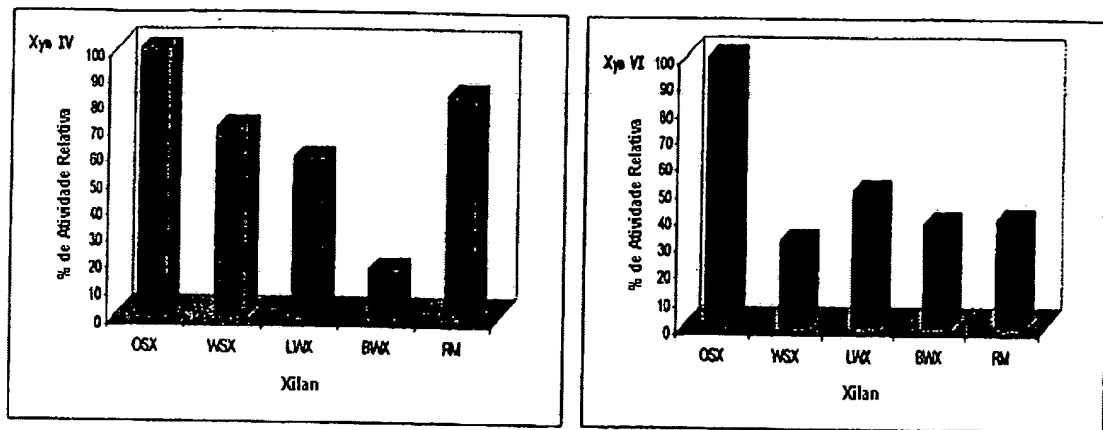


Figura 15A-B

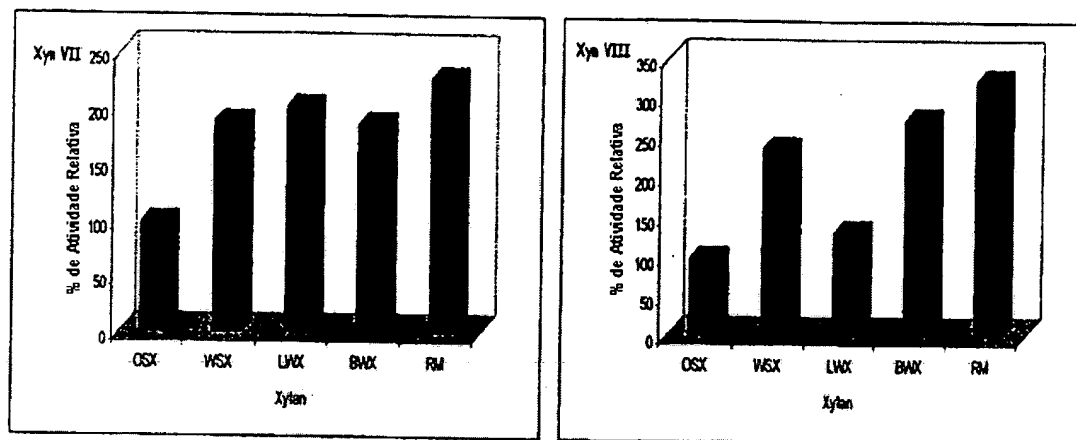


Figura 15C-D

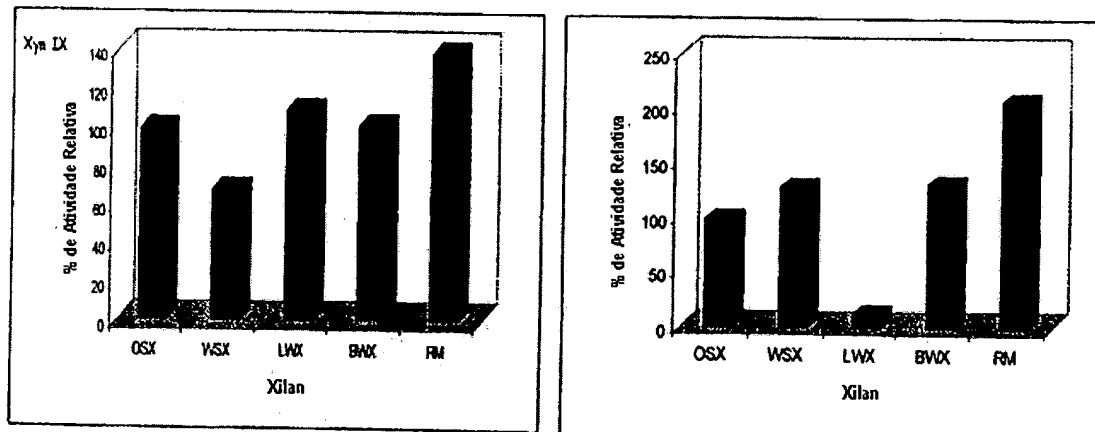


Figura 15E-F

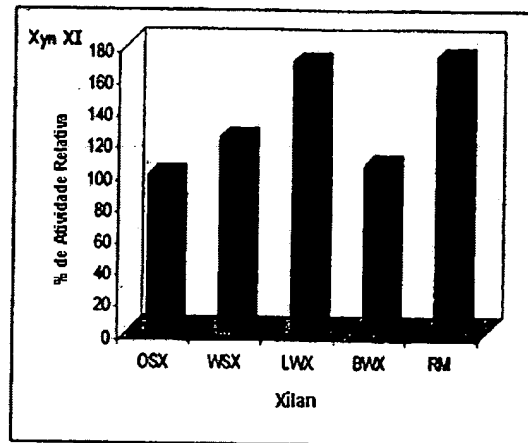


Figura 15G

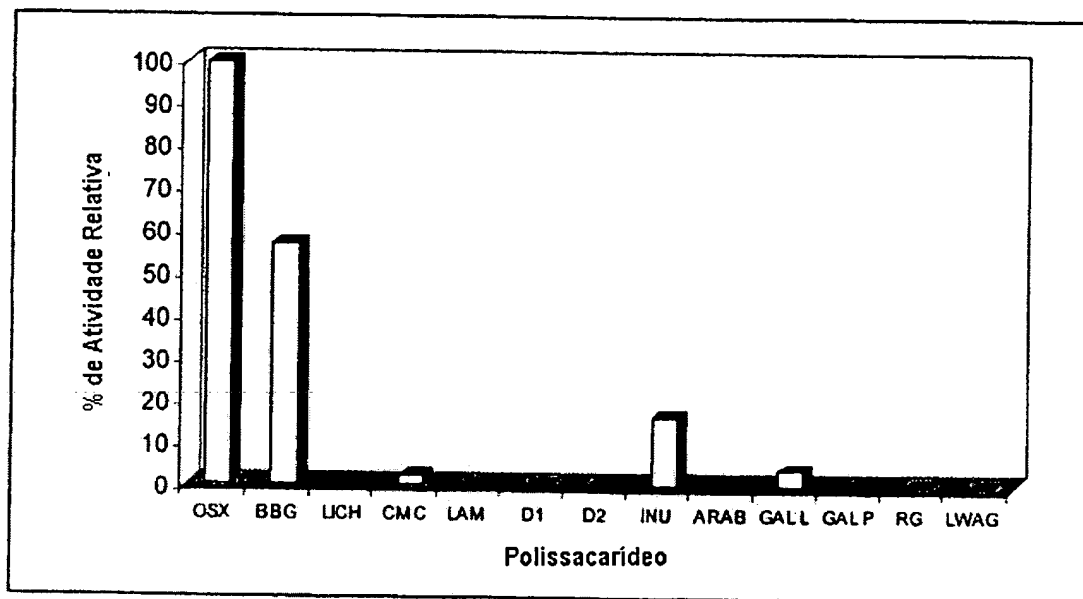


Figura 16

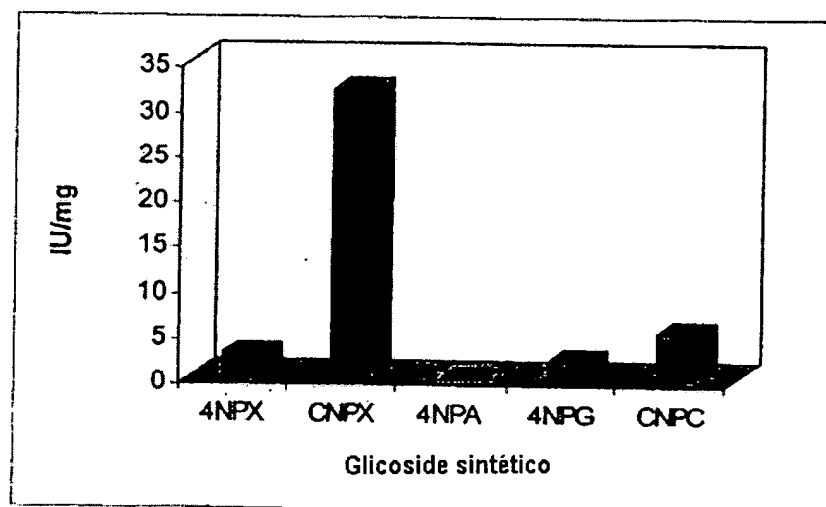


Figura 17

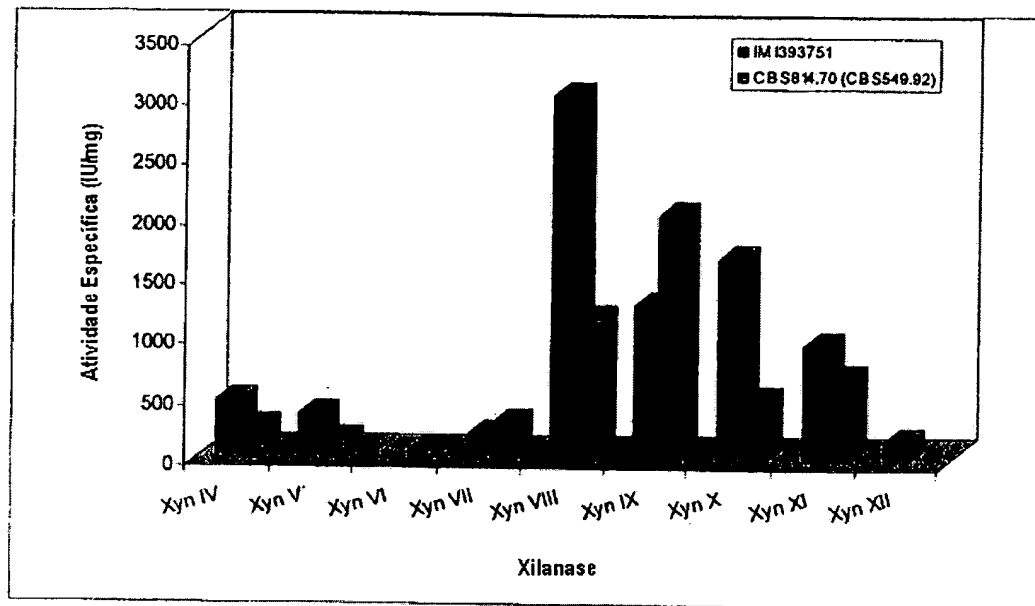


Figura 18

spec1908

SISTEMAS DE ENZIMA DE TALAROMYCES EMERSONII

A invenção relaciona-se as cepas de Talaromyces emersonii que são termoestáveis e codificam enzimas termoestáveis. As enzimas retêm a atividade em temperaturas
5 acima de 55°C. Estas cepas e enzimas encontram o uso em uma variedade de processos da redução resíduos à produção de ingredientes alimentícios de alimento novos e à produção de combustíveis biológicos.