

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

(21) **PI 0713090-2 A2**

(22) Data de Depósito: 22/06/2007
(43) Data da Publicação: 30/10/2012
(RPI 2182)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 19/14
C12N 9/24
C12N 9/42

(54) **Título:** COMPOSIÇÕES DE ENZIMA E MÉTODOS PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA APERFEIÇOADA DE CELULOSE

(30) **Prioridade Unionista:** 22/06/2006 US 60/815,891

(73) **Titular(es):** logen Energy Corporation

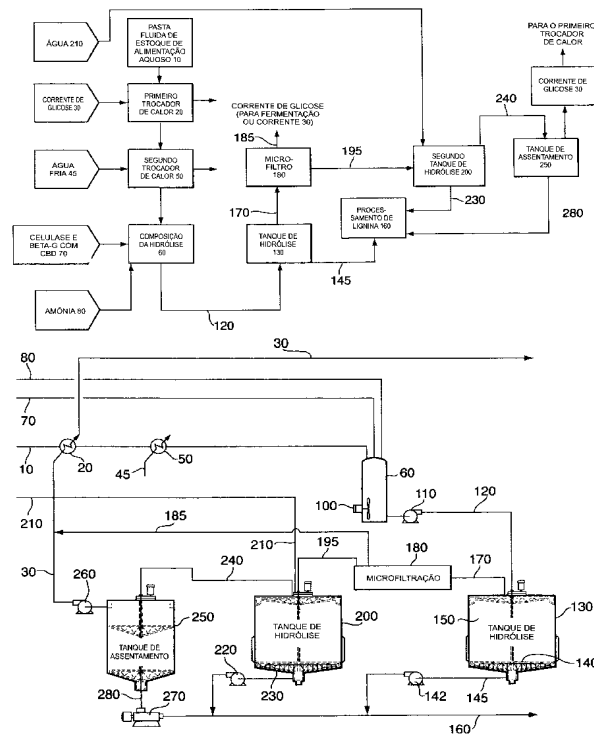
(72) **Inventor(es):** Jeffrey S. Tolan, John Tomashek, Theresa White

(74) **Procurador(es):** Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT CA2007001132 de 22/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/147263de 27/12/2007

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÕES DE ENZIMA E MÉTODOS PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA APERFEIÇOADA DE CELULOSE. A presente invenção refere-se a um processo para a hidrólise enzimática de celulose para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose a partir de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado e enzimas para uso no processo. O processo compreende hidrólise parcial de uma pasta fluida aquosa de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado com enzimas celulase, uma ou mais do que uma enzima b glicosidade e um agente de ligação para ligação da b-glicosidade aos sólidos de fibra presentes na pasta fluida aquosa. Os sólidos de fibra separados são, desse modo, obtidos, e, em seguida, ressuspensos em uma solução aquosa para produzir uma pasta fluida ressuspensa. A hidrólise é, em seguida, continuada para produzir o produto de hidrólise compreendendo glicose.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES DE ENZIMA E MÉTODOS PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA APERFEIÇOADA DE CELULOSE**".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se às enzimas para a hidrólise de celulose e métodos de uso das mesmas. Mais especificamente, a presente invenção se refere às enzimas celulase e β -glicosidase para hidrólise enzimática de celulose para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose a partir de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado.

10 Antecedentes da Invenção

O etanol combustível é atualmente produzido de estoques de alimentação tais como amido de milho, cana de açúcar e beterrabas de açúcar. Contudo, o potencial para produção de etanol destas fontes é limitado, visto que muita da gleba de terra cultivada que é adequada para a produção
15 destas colheitas já está em uso como uma fonte de alimento para seres humanos. Além disso, a produção de etanol a partir deste estoque de alimentação tem um impacto negativo no ambiente porque os combustíveis fósseis usados no processo de conversão produzem dióxido de carbono e outros subprodutos.

20 A produção de celulose a partir de estoques de alimentação contendo celulose, tais como resíduos agrícolas, gramas e resíduos de área florestal, tem recebido muita atenção nos anos recentes. As razões para isto são porque estes estoques de alimentação são amplamente disponíveis e pouco custosos, e seu uso para produção de etanol proporciona uma alter-
25 nativa a queima ou aterro de materiais de resíduo lignocelulósico. Além disso, um subproduto de conversão de celulose, lignina, pode ser usado como um combustível para energizar o processo ao invés de combustíveis fósseis. Vários estudos têm concluído que, quando o ciclo de produção total e consumo é levado em conta, o uso de etanol produzido de celulose gera perto
30 de zero gases de estufa.

Os estoques de alimentação celulósicos que são os mais promissores para produção de etanol incluem (1) resíduos agrícolas tais como

ferragem de milho, espigas de milho, fibra de milho, palha de trigo, palha de cevada, palha de aveia, cascas de aveia, palha de arroz, cascas de arroz, palha de canola, e ferragem de feijão-soja; (2) gramas tais como grama de vara, miscanthus, grama de corda, grama de centeio e grama de canário de cana; (3) biomassa de área florestal tais como fibra de polpa de madeira reciclada, madeira dura, madeira macia e serragem; e (4) resíduos de processamento de açúcar, tais como bagaço e polpa de beterraba.

A primeira etapa de processo de conversão de estoque de alimentação lignocelulósico em etanol envolve quebra do material fibroso para liberar monômeros de açúcar, tais como glicose, a partir do estoque de alimentação para conversão em etanol na etapa subsequente de fermentação. Os dois processos primários são hidrólises ácida, que envolve a hidrólise do estoque de alimentação usando-se uma etapa simples de tratamento ácido, e hidrólise enzimática, que envolve um pré-tratamento ácido seguido por hidrólise com enzimas celulase.

No processo de hidrólise ácida, o estoque de alimentação é submetido a vapor e a um ácido forte, tal como ácido sulfúrico, a uma temperatura, concentração ácida e comprimento de tempo que são suficientes para hidrolisar a celulose em glicose e hemicelulose em xilose e arabinose. No caso quando ácido sulfúrico é usado, o ácido pode ser concentrado (25-80% em p/p) ou diluído (3-8% em p/p), medido como o peso de ácido no peso de solução aquosa acidificada que está presente com o estoque de alimentação. A glicose é, em seguida, fermentada a etanol usando-se levedura, e o etanol é recuperado e purificado por destilação.

No processo de hidrólise enzimática, a temperatura de vapor, concentração ácida e tempo de tratamento são escolhidos para serem mais brandos do que no processo de hidrólise ácida, tal que a área superficial da celulose é grandemente aumentada à medida que o estoque de alimentação fibroso é convertido em uma textura turva, mas existe pouca conversão da celulose em glicose. A celulose pré-tratada é, em seguida, hidrosilada a glicose em uma etapa subsequente que usa enzimas celulase, e o vapor/tratamento ácido neste caso é conhecido como pré-tratamento. Antes da

adição de enzima, o pH do estoque de alimentação ácido é ajustado a um valor que é adequado para a reação de hidrólise enzimática. Tipicamente, isto envolve a adição de álcali a um pH entre cerca de 4 a cerca de 6, que é a faixa de pH ótima para celulases, embora o pH possa ser mais alto se celu-
5 lulases alcalofílicas são usadas.

Em um tipo de processo de pré-tratamento, a pressão produzida pelo vapor é trazida para baixo rapidamente com descompressão explosiva, que é conhecida como explosão de vapor. Foody (Patente dos Estados Uni-
10 dos N° 4.461.648) descreve o equipamento e condições usadas no pré-tratamento de explosão de vapor. A explosão de vapor com ácido sulfúrico adicionado para alcançar um pH de 0,4 a 2,0 tem sido o processo de pré-tratamento padrão por duas décadas. Ele produz material pré-tratado que é uniforme, e requer menos enzima celulase para hidrolisar celulase do que outros processos de pré-tratamento.

15 As enzimas celulase catalisam a hidrólise da celulose (ligações β -1, 4-D-glucan) no estoque de alimentação em produtos tais como glicose, celobiose, e outros celooligossacarídeos. A celulase é um termo genérico que denota uma mistura de multienzima compreendendo exo-celobio-
20 hidrolases (CBH), endoglucanases (EG), e β -glicosidases (β G) que podem ser produzidas por várias plantas e microorganismos. As enzimas celulase operam sinergisticamente para hidrolisar celulose em glicose. CBHI e CBHII geralmente agem nas extremidades dos polímeros de glicose em microfibrilas de celulose que liberam celobiose (Teeri e Koivula, *Carbohydr. Europe*,
25 1995, 12:28-33), enquanto as endoglucanases agem em localizações aleatórias na celulose. Juntas, estas enzimas hidrolisam celulose em celooligossacarídeos, principalmente celobiose. A celobiose é hidrosilada em glicose por β -glicosidase. É conhecido que muitas exo-celobio-hidrolases (CBH) e endonucleases (EG) se ligam a celulose no estoque de alimentação, via módulos de ligação de carboidrato (CBMs), tais como domínios de ligação de ce-
30 lulose (CBDs), enquanto muitas enzimas β -glicosidase, incluindo enzimas β -glicosidase de *Trichoderma* e *Aspergillus*, não contêm tais módulos de ligação e, desse modo, permanecem em solução. Enzimas celulase podem con-

ter uma região ligante que liga o domínio catalítico ao módulo de ligação de carboidrato. Acredita-se que a região ligante facilita a atividade do domínio cataliticamente ativo.

5 Enzimas celulase contendo um CBD foram produzidas por engenharia genética. Por exemplo, a Patente dos Estados Unidos N° 5.763.254 (Wöldike *et al*) descreve a produção de enzimas de degradação de celulose geneticamente projetadas derivadas de domínios de ligação de carboidrato contendo *Humicola*, *Fusarium* e *Myceliophthora*. O objetivo dos estudos foi produzir enzimas de degradação de celulose ou hemicelulose com novas combinações do domínio cataliticamente ativo, a região ligante e o CBD, ou para produzir enzimas de degradação de celulose ou hemicelulose contendo CBD daquelas que carecem de um CBD. Contudo, a capacidade destas novas enzimas hidrolisarem estoque de alimentação lignocelulósico não foi demonstrada.

15 Um problema significativo com processos de hidrólise enzimática é a grande quantidade de enzima celulase requerida, que aumenta o custo do processo. O custo de celulose monta em mais do que 50% do custo de hidrólise. Existem vários fatores que contribuem para o requerimento de enzima, mas um de significância particular é a presença de compostos que reduzem a taxa de reação de celulase e/ou microorganismos na fermentação subsequente do açúcar. Por exemplo, glicose liberada durante o processo inibe celulases, particularmente β -glicosidase (Alfani *et al.*, *J. Membr. Sci.*, 1990, 52:339-350). A celobiose produzida durante hidrólise de celulose é um inibidor particularmente potente de celulase (Tolan *et al*, em *Biorefineries – Industrial Processes and Products*, Vol. 1 Ed. Kamm *et al.*, Capítulo 9, página 203). Outros inibidores solúveis são produzidos durante pré-tratamento, incluindo produtos de degradação de açúcar, tais como furfural e hidroxil-metil-furfural, derivados de furan, ácidos orgânicos, tal como ácido acético, e compostos fenólicos solúveis derivados de lignina. Estes compostos também inibem levedura, que diminui produção de etanol e, consequentemente, torna o processo mais custoso. Embora os efeitos de inibidores possam ser reduzidos pela realização de hidrólise em uma concentração

mais diluída, isto requer o uso de um reator de hidrólise grande, que se soma a despesa do processo.

Sacarificação e Fermentação (SSF) simultâneas é um método de conversão de biomassa lignocelulósica em etanol que minimiza inibição de glicose de celulase (ver, por exemplo, Ghost *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*, 1982, 4:425-430). Em um sistema de SSF, hidrólise enzimática é efetuada concorrentemente com fermentação de levedura de glicose em etanol. Durante SSF, a levedura remove glicose do sistema, fermetando-a em etanol, e isto diminui a inibição da celulase. Contudo, uma desvantagem deste processo é que as enzimas celulase são inibidas pelo etanol. Em adição, SSF é tipicamente efetuada em temperaturas de 35-38°C, que é mais baixa do que os 50°C ótimos para celulase, e mais alta do que os 28°C ótimos para levedura. Esta temperatura intermediária resulta em desempenho abaixo do padrão por ambas enzimas celulase e a levedura. Como um resultado, a hidrólise requer tempos de reação muito longos e vasos de reação muito grandes, ambos os quais são custosos.

Outra abordagem que foi proposta para reduzir a inibição por glicose, celobiose, e outros inibidores solúveis é a remoção de produtos de hidrólise através de toda hidrólise, efetuando-se a reação em um reator de membrana. Um reator de membrana contém uma membrana de ultrafiltração que retém partículas e componentes de alto peso molecular, tal como enzima, enquanto permite que moléculas de peso molecular mais baixo, tais como açúcares, passem através da membrana como peremeado.

Um exemplo de um processo utilizando um reator de membrana é descrito em Ohlson and Trägårdh (*Biotech. Bioeng.*, 1984, 26:647-653). Neste processo, a hidrólise enzimática de salgueiro pré-tratado (uma espécie de árvore de salgueiro) é realizada em um reator com uma membrana tendo um corte de peso molecular de 10.000. As celulases têm um peso molecular de 50.000 e são, portanto, retidas pela membrana no reator de hidrólise, enquanto os açúcares são removidos e substituídos com solução tampão de um recipiente de alimentação com substrato fresco adicionado intermitentemente. A taxa de hidrólise, bem como a produção dos açúcares solú-

veis, é aumentada devido à remoção de inibidores. Contudo, uma desvantagem de tais reatores é que as membranas requeridas para um sistema de hidrólise comercial são extremamente grandes e caras. As membranas são também propensas a turvamento por sólidos suspensos presentes na mistura de reação.

Vários grupos têm investigado a recuperação e reciclagem de enzimas celulase durante hidrólise enzimática para reduzir a quantidade de enzima necessária durante o processo de conversão. Em alguns casos, isto tem também envolvido a remoção contínua de hidrolisados a partir da mistura de reação para remover compostos inibitórios.

Por exemplo, Ishihara *et al* (*Biotech. Bioeng.*, 1991, 37:948-954) descrevem a reciclagem de enzimas celulase durante a hidrólise de madeira dura vaporizada e polpa kraft de madeira dura. O processo envolve a remoção de uma mistura de reação de celulase a partir do reator, seguido pela remoção de resíduo insolúvel contendo lignina a partir da mistura por filtração com sucção. As enzimas celulase que estão no filtrado são separadas dos produtos de hidrólise, tais como glicose e celubiose, por ultrafiltração e, em seguida, retornadas para o reator de hidrólise. Conforme citado pelos investigadores, uma vantagem deste sistema é que a etapa extra de remoção de sólidos seria não-prática em uma aplicação industrial devido à elevação no custo de matéria-prima. Em adição, muitas das celulases permanecem ligadas à celulose, e são difíceis de recuperar.

Larry *et al* (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1986, 25:256-261) descrevem uma abordagem para reutilização de celulases que envolve realização da hidrólise em um reator de coluna contendo celulase (Floco Solka). Os açúcares hidrolisados são continuamente removidos por percolação da coluna com uma corrente constante de tampão. De acordo com os investigadores, a remoção de produtos de açúcar deve reduzir inibição do produto, e aumentar as eficiências de hidrólise. Contudo, hidrólise inadequada é obtida, visto que enzimas β -glicosidase não-ligada e endoglucanase eluem da coluna.

Knutsen e Davis (*Appl. Biochem. Biotech.*, 2002, 98-100:1161-

1172) reportam um processo de sedimentação inclinada e ultrafiltração combinadas para recuperação de enzimas celulase durante a hidrólise de biomassa lignocelulósica. O objetivo do processo é remover partículas lignocelulósicas grandes de modo que um filtro de membrana usado durante uma etapa subsequente de ultrafiltração não se torne entupido. O processo primeiro envolve tratamento de partículas lignocelulósicas com enzimas celulase e, em seguida, alimentação da mistura resultante no assentador inclinado. Partículas lignocelulósicas grandes, incluindo enzima ligada às partículas, são retidas no assentador inclinado, enquanto partículas menores e enzima solúvel são transportadas com o transbordamento do assentador. O transbordamento é, em seguida, alimentado para uma unidade de ultrafiltração de fluxo cruzado para recuperar celulasas não-ligadas, enquanto permite a passagem de açúcares. Após ultrafiltração, as celulasas recuperadas são adicionadas ao reator de hidrólise. As partículas lignocelulósicas que permanecem no assentador inclinado, junto com a enzima ligada, são retornadas para o reator junto com o fluxo inferior do assentador. Uma desvantagem deste sistema é que a operação de tal sistema na escala de um reator de hidrólise comercial, que é, do mesmo modo, para estar cerca de 21,34 m (70 pés) elevado e processa milhares de galões de pasta fluida por hora, seria proibitivamente difícil. Uma segunda desvantagem deste sistema é que a concentração de glicose e celobiose no reator permanecem não-mudadas através de todo o processo de modo que um nível alto de inibição ainda ocorrerá. Uma desvantagem adicional do processo é que ele requer uma etapa de ultrafiltração custosa para recuperar celulasas não-ligadas.

Mores *et al* (*Appl. Biochem. Biotech.*, 2001, 91-93:297-309) reporta um processo de sedimentação inclinada e ultrafiltração combinadas similar àquele descrito por Knutsen e Davis (*supra*). Contudo, o processo de Mores *et al* envolve uma etapa extra de clareamento envolvendo submeter o transbordamento do assentador à microfiltração antes da ultrafiltração para reduzir turvamento da membrana de ultrafiltração. O processo de Mores *et al* seria submetido às mesmas limitações conforme aquele descrito por Knutsen e Davis (*supra*).

A Patente dos Estados Unidos N° 3.972.775 (Wilke *et al*) descreve um processo para reciclagem de celulase em que os produtos de hidrólise são separados em uma fase contendo açúcar aquosa e uma fase sólida contendo sólidos gastos não-hidrolisados após a hidrólise ser completa-
5 tada. Os sólidos gastos são lavados com água para recuperar enzima adsorvida nos mesmos, e a água de lavagem resultante contendo a enzima desorvida é alimentada para a reação de hidrólise. Os sólidos gastos remanescentes podem ser usados como uma fonte de combustível para o sistema. Contudo, o processo de Wilke *et al* incorre no custo da lavagem de água
10 adicional após a hidrólise, que é significativa devido à grande quantidade de material sólido e a natureza do particulado fino dos sólidos. Em adição, o processo não resulta na remoção de inibidores de enzimas celulase presentes durante a reação de hidrólise, visto que a separação de hidrolisados é efetuada após completção da reação de hidrólise.

15 Ramos *et al* (*Enzyme Microb. Technol.*, 1993, 15:19-25) descrevem um processo em que aparas de eucalipto explodidas por vapor são hidrolisadas usando-se celulase com remoção de açúcares solúveis, e a reciclagem de enzima. O processo envolve cessamento da reação em tempos de incubação selecionados, e coleta do resíduo contendo enzima não-
20 hidrolisada em um filtro de vidro sinterizado. O resíduo contendo enzima é lavado com tampão de hidrólise para remover açúcares solúveis. O resíduo lavado é, em seguida, ressuspensado em enzima β -glicosidase fresca contendo tampão de hidrólise fresco, e incubado a 45°C para hidrólise subsequente. Um problema com este processo é que a adição repetida de β -
25 glicosidase fresca após ressuspensão aumentaria significativamente o custo do processo.

30 Lee *et al* (*Biotech. Bioeng.*, 1994, 45:328-336) examinam a reciclagem de enzimas celulase em um procedimento envolvendo mais de cinco etapas sucessivas de hidrólise. O processo envolve adição de enzimas celulase e β -glicosidase (Novozym® 188) a vidoeiro tratado com peróxido, e recuperação do substrato residual por filtragem após 12 horas de hidrólise. O substrato fresco é, em seguida, adicionado ao substrato residual recuperado

para alcançar uma concentração de substrato total de 2%, e a mistura resultante é ressuspensa em β -glicosidase contendo tampão, e a hidrólise é permitida continuar. A reciclagem de celulase seguida por hidrólise é subsequentemente repetida três vezes. Também descrito é um procedimento para
5 reciclagem de celulases presentes na mistura de reação completa ambos antes e após toda a celulose ser hidrolisada. Similar a Ramos *et al.*, uma limitação deste processo é que a β -glicosidase deve ser adicionada à reação a cada etapa de reciclagem.

A Patente dos Estados Unidos N° 5.962.289 (Kilburn *et al*) descreve uma hidrólise enzimática de três fases. A primeira etapa do processo
10 envolve adição de ambas endoglucanase e exoglucanase a um material lignocelulósico a ser hidrolisado a celobiose. A segunda etapa envolve adição deste material a uma coluna Avicel® para adsorver a endoglucanase e exoglucanase. Em uma terceira etapa, o eluente contendo celobiose é, em seguida, aplicado a uma segunda coluna Avicel® contendo β -glicosidase imobilizada via um CBD. A β -glicosidase imobilizada hidrolisa a celobiose em
15 glicose. Uma limitação deste método é que a produção de glicose é efetuada em três etapas de processo distintas, o que é altamente complexo e custoso. Uma segunda limitação é que o envio da pasta fluida de material lignocelulósico parcialmente hidrolisado através da coluna de Avicel® em uma taxa de
20 fluxo alta de um processo de hidrólise comercial é muito difícil. Em adição, os efeitos altamente inibitórios de celobiose estão presentes durante a hidrólise de celulose.

Atualmente, existe muita dificuldade na técnica para operar uma
25 hidrólise enzimática de celulose eficiente. Um obstáculo chave é superar os efeitos inibitórios de glicose e, especialmente, celobiose em celulase. O desenvolvimento de tal sistema permanece um requerimento crítico para um processo converter celulose em glicose.

Sumário da Invenção

30 A presente invenção se refere a enzimas para a hidrólise de celulose e métodos de uso das mesmas. Mais especificamente, a presente invenção se refere a enzimas celulase e β -glicosidase para a hidrólise enzi-

mática de celulose para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado.

É um objetivo da invenção proporcionar um método aperfeiçoado para o tratamento de estoques de alimentação lignocelulósicos.

5 De acordo com a presente invenção, é provida uma composição de enzima para a hidrólise enzimática de celulose para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose a partir de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, a composição de enzima compreendendo enzi-
10 mas celulase, uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase e um agente de ligação para ligação da enzima β -glicosidase ao estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, no qual a hidrólise é efetuada por:

(i) hidrolisação parcial de uma pasta fluida aquosa do estoque de
15 alimentação lignocelulósico pré-tratado com a composição de enzima para produzir uma pasta fluida hidrosilada compreendendo glicose, oligômeros de glicose, ou uma combinação destes, e sólidos de fibra não-hidrosilados compreendendo celulose e lignina;

(ii) separação dos sólidos de fibra não-hidrosilados a partir da
20 pasta fluida hidrosilada para produzir sólidos de fibra separados, em que as enzimas celulase e a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase se ligam aos sólidos de fibra separados;

(iii) ressuspensão dos sólidos de fibra separados em uma solu-
ção aquosa para produzir uma pasta fluida ressuspensa; e

(iv) continuação da hidrólise da pasta fluida ressuspensa para
produzir o produto de hidrólise compreendendo glicose.

25 O agente de ligação pode ser um módulo de ligação de carboi- drato operavelmente ligado a uma ou mais do que uma enzima β - glicosidase. Preferivelmente, o módulo de ligação de carboidrato é um domí- nio de ligação de celulose.

30 A presente invenção também pertence à composição de enzima conforme descrita acima, na qual as enzimas celulase são produzidas por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combi- nação destas. Preferivelmente, as enzimas celulase são produzidas por *Tri-*

choderma.

A presente invenção também pertence à composição de enzima conforme descrita acima, no qual as enzimas celulase compreendem uma enzima celobio-hidrolase (CBH) selecionada a partir do grupo consistindo em enzimas celulase CBHI e CBHII, e combinações destas, e uma enzima endoglucanase (EG) selecionada a partir do grupo consistindo em enzimas celulase EGI, EGII, EGIV, EGV e EGVI, e combinações destas.

A presente invenção também pertence à composição de enzima conforme descrita acima, na qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), cerca de 75% a cerca de 100% (p/p) das enzimas celulase totais presentes na composição de enzima se ligam aos sólidos de fibra presentes na pasta fluida aquosa.

A presente invenção também pertence à composição de enzima conforme descrita acima, na qual a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase é produzida por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas. Preferivelmente, a enzima β -glicosidase é produzida por *Trichoderma* ou *Aspergillus*. A enzima β -glicosidase pode estar ocorrendo naturalmente, ou ser uma proteína de fusão geneticamente modificada.

A presente invenção também pertence à composição de enzima conforme descrita acima, na qual cerca de 75% a cerca de 100% (p/p), ou cerca de 90% a cerca de 100% (p/p) da enzima β -glicosidase total presentes na composição de enzima compreendem um domínio de ligação de celulose. O domínio de ligação de celulose pode ser um domínio de ligação de celulose de Família I. Além disso, o domínio de ligação de celulose pode ser um domínio de ligação de celulose bacteriana ou fúngica. Opcionalmente, a enzima β -glicosidase compreende um ligante, que liga operavelmente o domínio de ligação de celulose a enzima β -glicosidase.

De acordo com a presente invenção, é também provido um uso de uma composição de enzima para a hidrólise enzimática de celulose para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose a partir de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, a composição de enzima

compreendendo enzimas celulase, uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase, e um agente de ligação para ligação da enzima β -glicosidase ao estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, no qual o uso da composição de enzima compreende:

5 (i) hidrolisação parcial de uma pasta fluida aquosa do estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado com a composição de enzima para produzir uma pasta fluida hidrosilada compreendendo glicose, oligômeros de glicose, ou uma combinação destes, e sólidos de fibra não-hidrosilados compreendendo celulose e lignina;

10 (ii) separação dos sólidos de fibra não-hidrosilados a partir da pasta fluida hidrosilada para produzir sólidos de fibra separados, nos quais as enzimas celulase e a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase se ligam aos sólidos de fibra separados;

(iii) ressuspensão dos sólidos de fibra separados em uma solu-
15 ção aquosa para produzir uma pasta fluida ressuspensa; e

(iv) continuação da hidrólise da pasta fluida ressuspensa para produzir o produto de hidrólise compreendendo glicose.

O agente de ligação é um módulo de ligação de carboidrato operavelmente ligado a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase. Preferi-
20 velmente, o módulo de ligação de carboidrato é um domínio de ligação de celulose.

A presente invenção também pertence ao uso da composição de enzima conforme descrito acima, no qual as enzimas celulase são produzi-
25 das por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas. Preferivelmente, as enzimas celulase são produzidas por *Trichoderma*.

A presente invenção também pertence ao uso da composição de enzima conforme descrito acima, no qual as enzimas celulase compreendem
30 uma celobio-hidrolase (CBH) selecionada a partir do grupo consistindo em enzimas celulase CBHI e CBHII, e combinações destas, e uma endogluca-nase (EG) selecionada a partir do grupo consistindo em enzimas celulase EGI, EGII, EGIV, EGV, e combinações destas.

A presente invenção também pertence ao uso da composição de enzima conforme descrito acima, na qual, cerca de 75% e cerca de 100% (p/p) das enzimas celulase totais presentes na composição de enzima se ligam aos sólidos de fibra presentes na pasta fluida aquosa.

5 A presente invenção também pertence ao uso da composição de enzima conforme descrito acima, na qual a enzima β -glicosidase é produzida por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas. Preferivelmente, a enzima β -glicosidase é produzida por *Trichoderma* ou *Aspergillus*. A enzima β -glicosidase pode estar ocorrendo
10 naturalmente, ou ser uma proteína de fusão geneticamente modificada. A enzima β -glicosidase pode ser nativa ao hospedeiro, ou ser nativa a outro gênero ou espécie, e inserida no hospedeiro a ser expresso.

A presente invenção também pertence ao uso da composição de enzima conforme descrito acima, na qual cerca de 75% a cerca de 100%
15 (p/p), preferivelmente cerca de 90% a cerca de 100% (p/p) da enzima β -glicosidase total presentes na composição de enzima compreendem um domínio de ligação de celulose. O domínio de ligação de celulose pode ser um domínio de ligação de celulose de Família I. Além disso, o domínio de ligação de celulose pode ser um domínio de ligação de celulose bacteriana ou
20 fúngica. Opcionalmente, a enzima β -glicosidase compreende um ligante.

De acordo com a presente invenção, é também provido um processo para a hidrólise enzimática de celulose com uma composição de enzima compreendendo enzimas celulase, uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase e um agente de ligação para ligação da enzima β -glicosidase ao
25 estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, o processo compreendendo:

(i) hidrolisação parcial de uma pasta fluida aquosa do estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado com a composição de enzima para
30 produzir uma pasta fluida hidrosilada compreendendo glicose, oligômeros de glicose, ou uma combinação destes, e sólidos de fibra não-hidrosilados compreendendo celulose e lignina;

(ii) separação dos sólidos de fibra não-hidrosilados a partir da pasta fluida hidrosilada para produzir sólidos de fibra separados, no qual as enzimas celulase e a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase se ligam aos sólidos de fibra separados;

5 (iii) ressuspensão dos sólidos de fibra separados em uma solução aquosa para produzir uma pasta fluida ressuspensa; e

(iv) continuação da hidrólise da pasta fluida ressuspensa para produzir o produto de hidrólise compreendendo glicose.

O agente de ligação pode ser um módulo de ligação de carboi-
10 drato operavelmente ligado a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase. Preferivelmente, o módulo de ligação de carboidrato é um domínio de ligação de celulose.

O estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado pode ser obtido de palha de trigo, palha de aveia, palha de cevada, palha de milho,
15 palha de forragem, palha de feijão-soja, palha de canola, palha de arroz, cana de açúcar, bagaço, palha de vara, grama de capim de corda, grama de corda, ou miscanthus.

A presente invenção também pertence ao processo conforme descrito acima, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), a pasta
20 fluida aquosa tem um teor de sólidos suspensos ou não-dissolvidos de cerca de 3% a cerca de 30% (p/p). Esta pasta fluida aquosa pode ser concentrada antes da etapa de hidrolisação parcial (etapa(i)). Preferivelmente, a pasta fluida aquosa é preparada em água.

A presente invenção também pertence ao processo conforme descrito acima, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), o pH da
25 pasta fluida aquosa é de cerca de 4,5 a cerca de 5,5, ou entre cerca de 4,5 a 5,0. A temperatura da pasta fluida aquosa pode ser entre cerca de 45°C a cerca de 55°C.

A presente invenção também pertence ao processo conforme descrito acima, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), as enzi-
30 mas celulase são adicionadas a uma dosagem de cerca de 1,0 a cerca de 40,0 IU por grama de celulose. As enzimas celulase podem ser produzidas

por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas. Preferivelmente, entre cerca de 75% a 100% (p/p) das enzimas celulase totais presentes se ligam aos sólidos de fibra presentes na pasta fluida aquosa.

5 A presente invenção também pertence à composição, uso da composição, ou processo, conforme descritos acima, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), a uma ou mais do que uma β -glicosidase é adicionada a uma dosagem de cerca de 35 a cerca de 200 IU por grama de
10 celulose. As enzimas β -glicosidase podem ser produzidas por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas. Preferivelmente, a enzima β -glicosidase é produzida por *Aspergillus* ou *Trichoderma*. A enzima β -glicosidase pode ser nativa ao hospedeiro, ou ser nativa a outro gênero ou espécie, e inserida no hospedeiro a ser expresso.

A presente invenção também pertence ao processo conforme
15 descrito acima, no qual os sólidos não-hidrosilados são separados por microfiltração, centrifugação, filtração a vácuo, ou filtração por pressão. Preferivelmente, os sólidos não-hidrosilados são separados por microfiltração.

A etapa de continuação da hidrólise da pasta fluida ressuspensa
20 pode ser efetuada por cerca de 12 a cerca de 200 horas. Preferivelmente, uma corrente compreendendo glicose produzida na etapa (i) é combinada com uma corrente compreendendo glicose produzida na etapa (iv) para produzir uma corrente combinada de açúcar.

Preferivelmente, cerca de 70% a cerca de 100% de celulose na
pasta fluida aquosa é convertida em glicose.

25 Durante a etapa de ressuspensão (etapa (iii)), a solução aquosa pode ser água de processo.

A presente invenção também pertence ao processo conforme
30 descrito acima, no qual o processo é efetuado em um sistema de hidrólise que compreende um reator de hidrólise selecionado a partir do grupo consistindo em um tanque agitado, um tanque não-misturado, uma torre agitada, e uma torre não-misturada. A torre agitada ou torre não-misturada pode ser ou uma torre de fluxo descendente, ou uma torre de fluxo ascendente. O

processo pode ser um processo em batelada, ou um processo contínuo.

A presente invenção supera várias desvantagens da técnica anterior levando-se em conta as dificuldades encontradas nas etapas efetuadas durante a conversão de estoque de alimentação lignocelulósico em glicose. Pela separação dos sólidos hidrolisados da fase aquosa, e ressuspensão dos sólidos separados com uma solução aquosa, glicose, celobiose, e outros compostos presentes na fase aquosa que inibem as enzimas celulase são removidos, ou suas concentrações são reduzidas. Na ausência de glicose ou celobiose, ou pela diminuição de sua concentração, a hidrólise pode proceder com eficiência aumentada. Pela realização de uma hidrólise da pasta fluida de estoque de alimentação aquoso com enzimas celulase e enzima β -glicosidase que se ligam ao estoque de alimentação pré-tratado, a enzima β -glicosidase é transportada através da pasta fluida ressuspensa em vez de ser removida com a fase aquosa. Desde que a enzima β -glicosidase esteja presente na pasta fluida ressuspensa, quando a hidrólise é permitida continuar, qualquer celobiose que permanece no estoque de alimentação é eficientemente convertida em glicose. Além disso, a atividade de celulase estará presente quando a hidrólise é continuada, visto que as enzimas celulase também se ligam ao estoque de alimentação pré-tratado, e são transportadas através da pasta fluida ressuspensa. Uma outra vantagem da invenção é que a enzima β -glicosidase não necessita de ser adicionada durante hidrólise continuada da pasta fluida ressuspensa conforme requerido se a enzima permanecesse na fase aquosa, tornando, desse modo, o processo menos custoso.

Este sumário da invenção não descreve necessariamente todas as características da invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

Estas e outras características da invenção tornar-se-ão mais aparentes a partir da seguinte descrição na qual referência é feita aos desenhos em anexo, no qual:

A figura 1A mostra um fluxograma de processo ilustrando as etapas de processamento de um estoque de alimentação lignocelulósico de

acordo com as concretizações da invenção. FIGURA 1B mostra um fluxograma de processo ilustrando as etapas de processamento de um estoque de alimentação lignocelulósico usando reatores de hidrólise de fluxo ascendente.

5 As FIGURAS 2A e 2B mostram a hidrólise de 5% de celulose de palha de trigo pré-tratada por *Trichoderma* celulase contendo β -glicosidase com um CBD com e sem ressuspensão. A hidrólise com ressuspensão foi filtrada e ressuspensa em 24 horas, enquanto a hidrólise sem ressuspensão foi operada sem interrupção. Na FIGURA 2A, a dosagem de celulase é 16
10 mg/g, e na FIGURA 2B, a dosagem de celulase é 24 mg/g.

A figura 3 mostra a hidrólise de 5% de celulose de palha de trigo pré-tratada por *Trichoderma* celulase contendo β -glicosidase nativa que carece de um CBD. As hidrólises foram filtradas e ressuspensas em 24 horas.

As figuras 4A e 4B são géis de SDS-PAGE de β -glicosidase purificada sem um CBD (β G) e β -glicosidase com um CBD (β G-CDB) após incubação na presença (+) ou ausência (-) de palha de trigo pré-tratada. Na FIGURA 4A, a incubação foi efetuada a 4°C, e na FIGURA 4B, a incubação foi efetuada a 50°C. Após 30 minutos de incubação, as misturas de reação foram centrifugadas, e a fração de sobrenadante separada por SDS-PAGE, e
15 visualizadas por mancha azul de coomassie.
20

Descrição Detalhada

A seguinte descrição é de concretizações preferidas.

A presente invenção se refere a enzimas para a hidrólise aperfeiçoada de celulose. Mais especificamente, a presente invenção se refere a
25 enzimas celulase e enzimas β -glicosidase para a conversão enzimática aperfeiçoada de estoques de alimentação lignocelulósicos, e métodos de uso das mesmas.

A seguinte descrição é de uma concretização por meio de exemplo somente e sem limitação à combinação de características necessárias para efetuar a invenção em efeito.
30

A invenção proporciona uma composição de enzima e processo para a hidrólise de estoques de alimentação lignocelulósicos que aperfeiço-

am a economia de hidrólise enzimática pela diminuição da inibição por glicose e outros compostos. O processo envolve realizar uma hidrólise parcial de uma pasta fluida de estoque de alimentação pré-tratado com celulases e uma ou mais de uma β -glicosidase que se ligam ao estoque de alimentação pré-tratado, via um agente de ligação, e, em seguida, separação dos sólidos de fibra não-hidrolisados, que contêm lignina e celulose não-hidrolisada, a partir da fase aquosa, que contém glicose, oligômeros de glicose e celobiose. Os sólidos separados são, em seguida, ressuspensos em uma solução aquosa para produzir uma pasta fluida ressuspensa. A enzima celulases e β -glicosidase são transportadas através da pasta fluida ressuspensa em virtude de sua capacidade de se ligar aos sólidos. A hidrólise da pasta fluida ressuspensa é, em seguida, permitida continuar para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose. Pela separação da fase de sólidos e fase aquosa, glicose e outros inibidores solúveis, tal como celobiose, são removidos, ou suas concentrações são reduzidas, de modo que a hidrólise pode continuar sem ou com inibição reduzida.

O processo pode ser um processo contínuo, com alimentação contínua de pasta fluida de estoque de alimentação pré-tratado e retirada de produto de hidrólise. Alternativamente, o processo pode ser um processo em batelada.

O processo é efetuado em uma pasta fluida de estoque de alimentação de modo que a digestibilidade da celulose no estoque de alimentação pelas enzimas celulase é aumentada. As enzimas celulase convertem pelo menos uma porção da celulose no estoque de alimentação em glicose, celobiose, oligômeros de glicose, ou uma combinação destes.

O estoque de alimentação para o processo é um material lignocelulósico. Pelo termo "estoque de alimentação lignocelulósico", entende-se qualquer tipo de biomassa de planta, tal como, mas limitada a, biomassa de planta não-arborizada, colheitas cultivadas, tais como, mas não limitadas a, por exemplo, mas não limitadas a, gramas C4, tais como grama de vara, grama de corda, grama de centeio, miscanthus, grama de canário de cana, ou uma combinação destas, resíduos de processamento de açúcar, por e-

xemplo, mas não limitados a, bagaço, polpa de beterraba, ou uma combinação destas, resíduos agrícolas, por exemplo, mas não limitados a, forragem de feijão-soja, forragem de milho, palha de arroz, cascas de arroz, palha de cevada, espigas de milho, palha de trigo, palha de canola, palha de aveia, 5 cascas de aveia, fibra de milho, ou uma combinação destes, biomassa de área florestal, por exemplo, mas não limitada a, fibra de polpa de madeira reciclada, serragem, madeira dura, por exemplo madeira de álamo, madeira macia, ou uma combinação destes. Além disso, o estoque de alimentação lignocelulósico pode compreender material de despejo de celulose, ou maté- 10 rias de despejo de áreas florestais, tais como, mas não limitados a, papel para impressão de jornais, papelão e similares. O estoque de alimentação lignocelulósico pode compreender uma espécie de fibra ou, alternativamente, o estoque de alimentação lignocelulósico pode compreender uma mistura de fibras que se originam de estoques de alimentação lignocelulósicos dife- 15 rentes. Em adição, o estoque de alimentação lignocelulósico pode compreender estoques de alimentação lignocelulósicos frescos, estoque de alimentação lignocelulósico parcialmente seco, estoque de alimentação lignocelulósico totalmente seco, ou uma combinação destes.

Os estoques de alimentação lignocelulósicos compreendem ce- 20 lulose em uma quantidade maior do que cerca de 20%, mais preferivelmente maior do que 30%, mais preferivelmente maior do que 40% (p/p). Por exemplo, o material lignocelulósico pode compreender de cerca de 20% a cerca de 50% (p/p) de celulose, ou mais, ou qualquer quantidade entre estas, por exemplo, mas não limitado a, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 25 44, 46, 48 e 50% (p/p) de celulose. O estoque de alimentação lignocelulósico também compreende lignina em uma quantidade maior do que cerca de 10%, mais preferivelmente em uma quantidade maior do que cerca de 15% (p/p). O estoque de alimentação lignocelulósico pode também compreender pequenas quantidades de sacarose, frutose e amido.

30 Exemplos de estoques de alimentação lignocelulósicos preferidos incluem (1) despejos agrícolas, tais como forragem de milho, palha de trigo, palha de cevada, palha de canola, palha de aveia, palha de arroz, e

forragem de feijão-soja; e (2) gramas, tais como grama de vara, miscanthus, grama de corda e grama de canário de cana.

A presente invenção é praticada com material lignocelulósico que foi pré-tratado. Os métodos de pré-tratamento são pretendidos para distribuírem uma combinação suficiente de ação mecânica e química de modo a romper a estrutura de fibra e aumentar a área superficial de estoque de alimentação acessível a enzimas celulase. A ação mecânica inclui tipicamente, mas não está limitada a, o uso de pressão, moagem, agitação, desfiamento, compressão/expansão, ou outros tipos de ação mecânica. A ação química pode incluir, mas não está limitada a, o uso de calor (frequentemente vapor), ácido, álcali e solventes. Vários métodos de pré-tratamento químico e mecânico são bem-conhecidos na técnica.

Antes do pré-tratamento, o estoque de alimentação lignocelulósico pode ser lixiviado. Isto pode ser efetuado, por exemplo, conforme descrito no WO 02/070753 (Griffin *et al.*, que é incorporado aqui por referência). Contudo, mesmo se lixiviamento for praticado, uma quantidade substancial de composto de inibição é produzida no processo de pré-tratamento subsequente.

O pré-tratamento é empregado para aumentar a suscetibilidade da pasta fluida de estoque de alimentação lignocelulósico ser hidrolisada por enzimas celulase. Por exemplo, o pré-tratamento pode ser efetuado para hidrolisar a hemicelulose, ou uma porção desta, que está presente no estoque de alimentação lignocelulósico, em açúcares monoméricos, por exemplo, xilose, arabinose, manose, galactose, ou uma combinação destas. Preferivelmente, o pré-tratamento é realizado de modo que a hidrólise quase completa da hemicelulose e uma pequena quantidade de conversão de celulose em glicose, ocorra. A celulose é hidrolisada em glicose em uma etapa subsequente que usa enzimas celulase. Durante o pré-tratamento, tipicamente um ácido diluído, a uma concentração de cerca de 0,02% (p/v) a cerca de 2% (p/v), ou qualquer quantidade entre estas (medida como a porcentagem de peso de ácido puro no peso total de estoque de alimentação seco mais solução aquosa) é usado para o pré-tratamento do estoque de alimen-

tação lignocelulósico. Preferivelmente, o pré-tratamento é efetuado a uma temperatura de cerca de 180°C a cerca de 250°C por um tempo de cerca de 6 segundos a cerca de 120 segundos, e um pH de cerca de 0,8 a cerca de 2,0. O pré-tratamento pode ser efetuado em um estágio simples ou em mais
5 do que um estágio. Preferivelmente, pelo menos um estágio é efetuado na faixa de temperatura, por um período de tempo e a faixa de pH colocados acima.

Uma abordagem ao pré-tratamento do estoque de alimentação é explosão com vapor, usando as condições de processo descritas nas Patentes dos Estados Unidos N° 4.461.648 e 4.237.226 (que são aqui incorpora-
10 das por referência). Outro método de pré-tratamento da pasta fluida de estoque de alimentação envolve pré-tratamento contínuo, significando que o estoque de alimentação lignocelulósico é bombeado através de um reator continuamente. Pré-tratamento ácido contínuo é familiar àqueles versados na
15 técnica, ver, por exemplo, Patente de Patente dos Estados Unidos N° 5.536.325 (Brink); Pedido dos Estados Unidos co-pendente N° US 60/687.224 (Foody e Tolan); Patente dos Estados Unidos N° 4.237.226 (Grethlein; que são aqui incorporados por referência). Outros métodos que são conhecidos na técnica podem ser usados conforme requerido para a prepa-
20 ração de um estoque de alimentação pré-tratado, por exemplo, mas não limitado a, aqueles descritos na Patente dos Estados Unidos N° 4.556.430 (Converse *et al.*; que é incorporado aqui por referência).

O estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado pode opcionalmente ser lavado com água antes da hidrólise enzimática. A etapa de
25 lavagem ou lixiviamento pode remover alguns dos inibidores de enzimas celulase e leveduras, tais como açúcares dissolvidos e produtos de degradação de açúcar, lignina dissolvida e compostos fenólicos, e outros compostos orgânicos no sistema. Contudo, embora lavagem após pré-tratamento caia dentro do escopo da invenção, ela pode não resultar na remoção de todas
30 as impurezas insolúveis presentes, e ela pode aumentar o custo do processo.

O material lignocelulósico pré-tratado é fluidificado em uma solu-

ção aquosa para produzir uma pasta fluida de estoque de alimentação aquosa, ou "pasta fluida aquosa". Por exemplo, mas sem desejar estar limitando, a solução aquosa pode ser água de processo, água fresca, condensado de vapor, ou correntes de reciclo de processo. A concentração de estoque de

5 alimentação lignocelulósico pré-tratado na pasta fluida aquosa depende do tamanho de partícula, retenção de água, capacidade de bomba, e outras propriedades do estoque de alimentação. Tipicamente, a concentração está entre cerca de 3% e 30% (p/p), ou entre cerca de 10% e cerca de 20% (p/p) de sólidos de fibra (também conhecidos como sólidos suspensos ou não-

10 dissolvidos), ou qualquer quantidade entre estas. A pasta fluida aquosa preferivelmente tem uma concentração de sólidos que a capacita a ser bombeada. Conforme é bem-conhecido na técnica, a concentração de sólidos suspensos ou não-dissolvidos pode ser determinada por filtragem de uma amostra de pasta fluida usando-se papel de filtro de microfibras de vidro, lava-

15 gem da massa do filtro com água, e secagem da massa durante a noite a 105°C. É preferido que os sólidos de fibra compreendam pelo menos cerca de 20% a cerca de 70% de celulose por peso, ou qualquer quantidade entre estas. Por exemplo, os sólidos suspensos podem compreender 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% ou 70% de celulose por peso.

20 O pH da pasta fluida aquosa é geralmente ajustado para dentro da faixa do pH ótimo para as enzimas celulase usadas. Geralmente, o pH da pasta fluida aquosa é ajustado para dentro de uma faixa de cerca de 3,0 a cerca de 7,0, ou qualquer pH entre esta. Tipicamente, o pH está dentro de uma faixa de cerca de 4,5 a cerca de 5,5, ou qualquer pH entre esta. Contudo,

25 deve ser apreciado que o pH da pasta fluida pode ser mais alto do que cerca de 4,5 a cerca de 5,5 se as enzimas celulase usadas são alcalofílicas ou acidofílicas. O pH da pasta fluida pode ser ajustado usando-se qualquer ácido ou base conhecido na técnica. Por exemplo, se a pasta fluida é básica (por exemplo, se um pré-tratamento básico é realizado), ácido sulfúrico pode

30 ser usado. Se a pasta fluida é ácida, o pH pode ser ajustado com bases selecionadas a partir do grupo consistindo em amônia, hidróxido de amônio, cal, hidróxido de cálcio, hidróxido de potássio, hidróxido de magnésio, hidró-

xido de sódio, e mistura destes. Preferivelmente, a base é selecionada a partir do grupo consistindo em amônia, hidróxido de amônio e hidróxido de sódio.

5 A temperatura da pasta fluida de estoque de alimentação aquosa é ajustada de modo que ela esteja dentro da faixa ótima para a atividade das enzimas celulase. Geralmente, uma temperatura de cerca de 45°C a cerca de 55°C, ou qualquer temperatura entre estas, é adequada para muitas enzimas celulase. Contudo, a temperatura da pasta fluida pode ser mais alta para enzimas celulase termofílicas.

10 As enzimas celulase e uma enzima β -glicosidase com agente de ligação são adicionadas à pasta fluida aquosa, antes, durante ou após o ajuste da temperatura e pH da pasta fluida aquosa após pré-tratamento. Preferivelmente, as enzimas celulase e β -glicosidase são adicionadas à pasta fluida de estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado após o ajuste da
15 temperatura e pH da pasta fluida. A hidrólise parcial do material lignocelulósico pré-tratado é, em seguida, realizada.

Uma celulase é uma enzima com atividade hidrolítica para celulose nos sólidos de fibra, e que compreende pelo menos um domínio catalítico. Uma enzima celulase geralmente tem domínios adicionais, incluindo,
20 mas não limitados a, um módulo de ligação de carboidrato, ou outros domínios funcionais.

Pelo termo "enzimas celulase" ou "celulases", entende-se uma mistura de enzimas que hidrolisam celulose. A mistura pode incluir glicobiohidrolases (GBH), celobio-hidrolases (CBH) e endoglucanases (EG). Embora
25 enzimas GBH possam formar um componente da mistura de enzima, seu uso na hidrólise enzimática de celulose é menos comum do que enzimas CBH e EG. Em um exemplo não-limitativo, a mistura inclui enzimas CBH e EG. A enzima GBH hidrolisa principalmente cadeias de polímero de celulose de suas extremidades para liberar glicose, enquanto a enzima CBH hidrolisa
30 principalmente cadeias de polímero de celulose de suas extremidades para liberar celobiose, e a enzima EG hidrolisa principalmente polímero de celulose no meio da cadeia. A enzima GBH pode ser uma enzima tendo uma ativi-

dade de tipo ECN^o3.2.1.73, a enzima CBH pode ter uma atividade de enzima de tipo ECN^o3.2.1.91, e a enzima EG pode ser uma atividade de tipo ECN^o3.2.1.4 ou ECN^o3.2.1.151.

5 As enzimas celulase podem ser produzidas por várias plantas e microorganismos. O processo da presente invenção pode ser efetuado com qualquer tipo de enzimas celulase, indiferente de sua fonte. Entre os mais amplamente estudados, celulases caracterizadas e comercialmente produzidas são aquelas obtidas de fungos do gênero *Aspergillus*, *Humicola* e *Trichoderma*, e das bactérias do gênero *Bacillus* e *Thermobifida*. A celulase
10 produzida pelos fungos filamentosos *Trichoderma longibrachiatum* compreende pelo menos duas enzimas celobio-hidrolase denominadas CBHI e CBHII, e pelo menos quatro enzimas EG. Também, celulases EGI, EGII, EGIII, EG V e EGVI foram isoladas de *Humicola insolens* (ver, Schulein *et al.*, *Proceedings of the Second TRICEL Symposium on Trichoderma reesei Cellulase and Other Hydrolases*, Espoo 1993, P. Suominen and T. Reinikainen, Eds. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki 8:109-116, que é aqui incorporado por referência).

A enzima CBHI é definida como uma CBH que hidrolisa principalmente cadeias por um mecanismo de retenção conforme seria conhecido
20 a um versado no assunto. A enzima CBHII pode ser um membro de uma Família 7, 10 ou Família 48 de glicohidrolases. Em uma concretização preferida, a enzima CBHII é um membro da Família 7. Em uma concretização mais preferida, a enzima CBHI é a CBHI da Família 7 de *Trichoderma*.

A enzima CBHII é definida como uma enzima que hidrolisa principalmente cadeias de polímero de celulose por um mecanismo de inversão
25 conforme seria conhecido a um versado no assunto. A enzima CBHII pode ser processiva. A enzima CBHII pode ser um membro da Família 6, 9 ou 74. Em uma concretização preferida, a enzima CBHII é um membro da Família 6. Em uma concretização mais preferida, a enzima CBHII é a CBHII da Família 6 de *Trichoderma*.
30

Exemplos de enzimas EG que podem ser usadas na prática desta invenção são colocados na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Exemplos de enzimas EG

Enzima EG	Família de Glico-idrolase
EGI	7
EGII	5
EGIII	12
EGIV	61
EGV	45
EGVI	74

Preferivelmente, as enzimas EG são enzimas fúngicas, tais como enzimas expressas de *Trichoderma*. As enzimas EG preferivelmente contêm um CBD (domínio de ligação de celulose), embora uma certa proporção das enzimas EG possa ser incluída na mistura de enzima celulase que carece de uma CBD.

A dosagem de enzima celulase é escolhida para converter celulose do estoque de alimentação pré-tratado em glicose. Por exemplo, uma dosagem apropriada de celulase pode ser cerca de 1,0 a 40,0 Unidades de Papel Filtro (FPU ou IU) por grama de celulose, ou qualquer quantidade entre estas. A FPU é uma medição padrão familiar ao versado no assunto, e é definida e medida de acordo com Ghose (*Pure and Appl. Chem.*, 1987, 59:257-268).

As enzimas celulase usadas na prática desta invenção se ligam a componentes do estoque de alimentação pré-tratado. Contudo, deve ser aparente que a composição de enzima pode compreender algumas celulases que não se ligam ao estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, tais como aquelas que não compreendem um domínio de ligação de celulase. A percentagem de enzimas celulase que se ligam à celulose (sólidos) pode estar entre cerca de 75% e 100% (p/p) das enzimas celulase totais presentes na composição de enzima: por exemplo, a percentagem de enzimas celulases que se ligam à celulose pode ser cerca de 75, 78, 80, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97 ou 100% (p/p) das enzimas celulase totais presentes na composição de enzima.

A conversão de celobiose em glicose é efetuada pela β -

glicosidase. Pelo termo " β -glicosidase" entende-se qualquer enzima que hidrolisa o dímero de glicose, celobiose, em glicose. A atividade da enzima β -glicosidase é definida por sua atividade pela Comissão de Enzima como ECNº3.2.1.21. As enzimas β -glicosidase para uso nesta invenção são solúveis em água. Existem muitos micróbios que produzem β -glicosidase, e as propriedades destas enzimas variam, incluindo estrutura (peso molecular, orientação tridimensional, composição de aminoácido, e local ativo), e atividade catalítica (taxa e cinética de hidrólise de celobiose, e capacidade de agir em outros substratos). A enzima β -glicosidase pode vir de várias fontes; contudo, em todos os casos, a enzima β -glicosidase é capaz de hidrolisar celobiose em glicose. A enzima β -glicosidase pode ser uma Família 1 ou Família 3 de glicosídeo hidrolase, embora outros membros de família possam ser usados na prática desta invenção. A enzima β -glicosidase preferida para uso nesta invenção é a proteína Bgl1 de *Trichoderma reesei*. Outras formas podem incluir outras proteínas Bgl de *Trichoderma* ou enzimas β -glicosidase de outros organismos.

A ligação da β -glicosidase ao estoque de alimentação pré-tratado é efetuada por um agente de ligação que liga a enzima β -glicosidase ao estoque de alimentação pré-tratado. Pelo termo "agente de ligação", entende-se qualquer composto químico para ligação da β -glicosidase aos sólidos de fibra. A afinidade do agente de ligação ao estoque de alimentação pré-tratado é forte o bastante para permitir a aderência da enzima β -glicosidase aos sólidos de fibra na pasta fluida de estoque de alimentação aquosa, permitindo, desse modo, que ela seja transportada através da segunda hidrólise (hidrólise continuada).

O agente de ligação pode ser um produto químico fixado à enzima β -glicosidase na forma de uma modificação química. Esta modificação envolve fixação à enzima de um produto químico com afinidade suficiente para os sólidos de fibra. Exemplos de produtos químicos adequados incluem detergentes, tensoativos, poliglicóis, proteínas e fragmentos de proteína. Exemplos de detergentes e tensoativos incluem, mas não estão limitados a, ácidos de bile (colato, deoxicolato, taurocolato, glicolato, e glicodeoxicolato,

são exemplos), alquil glicosídeos (n-nonil- β -D-glicopiranosídeo, n-octil- β -D-glicopiranosídeo, n-heptil- β -D-glicopiranosídeo, n-hexil- β -D-glicopiranosídeo, dodecil- β -D-maltosídeo, octil- β -D-tioglicopiranosídeo, glicopiranosídeo, e decil- β -D-maltosídeo, são exemplos, e detergentes zwitteriônicos. Exemplos de poliglicóis incluem, mas não estão limitados a, polietileno glicol e polioxietilenos.

O agente de ligação pode também ser uma proteína ou fragmento de proteína. Exemplos de proteína e fragmentos de proteína incluem aqueles descritos acima para uso como domínios de ligação. Exemplos adicionais de proteínas que podem servir como um agente de ligação incluem, mas não estão limitados a, hidrofobin, estreptolisina, swollenin ou expansin. Exemplos de fragmentos de proteína que podem servir como agente de ligação incluem, mas não estão limitados a, politriptofan, politrosin e hélices anfipáticas.

Preferivelmente, o agente de ligação é um domínio de ligação tal como um módulo de ligação de carboidrato (CBM) que é operavelmente ligado à enzima β -glicosidase. Pelo termo "módulo de ligação de carboidrato" ou "CBM", entende-se qualquer proteína e sequência de peptídeo que se ligam não-covalentemente ao(s) carboidrato(s) presente(s) nos sólidos de fibra. Preferivelmente, o módulo de ligação de carboidrato é um domínio de ligação de celulose (CBD) que se liga a celulose nos sólidos de fibra.

CBDs são encontrados na natureza como domínios discretos em proteínas, tais como celulasas, e também em enzimas não-hidrolíticas. Até aqui, mais de vinte e quatro famílias de sequências de CBD foram identificadas. O CBD para a prática desta invenção pode ser derivado de qualquer fonte de CBDs. Por exemplo, o CBD pode ser derivado de uma bactéria ou fungo, embora CBDs tenham sido isolados de uma variedade de outros organismos. Exemplos não-limitativos de micróbios dos quais CBD pode ser derivado incluem *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destes. Sequências de CBD preferidas para a prática da invenção são CBDs Tipo I, que são derivados de fungos. Alternativamente, a sequência de DNA que codifica um CBD pode ser preparada sinte-

ticamente por métodos conhecidos àqueles versados na técnica, tais como método de fosforamidita (Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letters*, 1981, 22:1859-1869, que é incorporado aqui por referência.

5 O termo "operavelmente ligado" se refere a uma ligação entre enzima β -glicosidase e o domínio de ligação que capacita o domínio de ligação a aderir aos sólidos de fibra na pasta fluida aquosa. A ligação pode ser via um ligante, ou o domínio de ligação pode estar ligado a β -glicosidase sem uma região ligante de intervenção.

10 Um outro exemplo de um agente de ligação que pode ser usado na prática da invenção é um produto químico que se associa com ambos a enzima β -glicosidase e os sólidos de fibra. Exemplos não-limitativos de tais produtos químicos incluem, mas não estão limitados a, polications, poliânions, floculantes e moléculas anfipáticas. Além disso, este químico pode ser uma proteína ou fragmento de proteína, tais como aqueles descritos acima para uso como domínios de ligação, ou um produto químico tal como aquele descrito acima para uso na modificação química.

15 Pelo termo "ligante", entende-se uma sequência de aminoácido unindo o domínio de ligação de celulose de uma enzima celulase ou β -glicosidase, e ligando-as ao domínio cataliticamente ativo da enzima. A região ligante pode ser hidrofílica e não-mudada, e enriquecida em certos aminoácidos, incluindo glicina, asparagina, prolina, serina, treonina, glutamina, ou combinações destas. Preferivelmente, a estrutura do ligante concede flexibilidade à sequência. Enquanto não se deseja estar ligado à teoria, a estrutura flexível é acreditada facilitar a atividade do domínio catalítico. Contudo, 20 conforme seria evidente a um versado no assunto, não é essencial que um ligante esteja presente.

25 A capacidade de uma enzima β -glicosidase ou uma enzima celulase se ligar à celulose pode ser determinada por ensaios de ligação de celulose usando-se material lignocelulósico pré-tratado. Tais ensaios são familiares àqueles versados na técnica, e envolvem contatar 5 gramas de material 30 lignocelulósico pré-tratado com 50 mg de enzima β -glicosidase, com agente de ligação, em uma solução aquosa por 5 a 15 minutos a uma temperatura

de 20°C a 40°C, em seguida separando-se os sólidos de fibra da enzima por filtração, e medindo-se a quantidade de enzima que permanece na solução. O agente de ligação se liga a β -glicosidase e aos sólidos de fibra, permitindo, desse modo, que a enzima β -glicosidase seja retida no reator de hidrólise junto com sólidos de fibra.

Qualquer fonte de β -glicosidase pode ser usada na prática da invenção. Por exemplo, a enzima β -glicosidase pode ser derivada de *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destes. Preferivelmente, a enzima β -glicosidase é derivada de *Trichoderma* ou *Aspergillus*. A enzima β -glicosidase derivada de *Trichoderma* é de peso molecular 74.000 (conforme medido por eletroforese de gel de SDS-poliacrilamida), e tem um ponto isoelétrico de 8,3 (conforme medido por eletroforese de gel de poliácridamida de focalização isoelétrica não-desnaturante). A enzima β -glicosidase pode ser nativa ao hospedeiro, ou pode ser nativa a outros gêneros ou espécies, e inserida no hospedeiro em que ela é expressa.

A β -glicosidase contendo um CBM, tal como um CBD, pode ser uma proteína de fusão produzida por um construto genético compreendendo uma sequência promotora, uma sequência que codifica β -glicosidase, e uma sequência que codifica um CBM. O construto genético é expresso em um sistema de expressão adequado, por exemplo, um sistema de expressão bacteriana ou fúngica, tal como *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destes. Em adição, enzimas β -glicosidase que ocorrem naturalmente com um CBM podem ser usadas na prática da invenção. As enzimas β -glicosidase que ocorrem naturalmente podem ser isoladas de *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destes. Por exemplo, uma β -glicosidase contendo CBD que ocorre naturalmente foi purificada e caracterizada a partir do fungo podre branco *Phanaerochaete chrysosporium* (Lyman *et al.*, *Appl. Environ. Micro.*, 1995, 61: 2976-2980, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência).

O nível de dosagem da β -glicosidase que é adicionado à pasta

fluida aquosa pode ser cerca de 5 a cerca de 400 unidades de β -glicosidase por grama de celulose, ou qualquer quantidade entre estes, ou de cerca de 35 a cerca de 200 unidades de β -glicosidase por grama de celulose, ou qualquer quantidade entre estes. A unidade de β -glicosidase é medida de acordo com o método de Ghose (supra).

É preferido que a concentração de β -glicosidase presente seja alta o bastante para assegurar que a celobiose não se acumule durante a hidrólise, e não iniba a ação de celulase. Será compreendido por aquele versado no assunto que *Trichoderma*, e outros micróbios de produção de celulose, produzem usualmente somente quantidades limitadas de β -glicosidase. Os métodos colocados em White e Hindle, Patente dos Estados Unidos N° 6.015.703 (que é incorporada aqui por referência) podem ser empregados para alcançar níveis aumentados de produção de β -glicosidase por *Trichoderma*. Alternadamente, a β -glicosidase pode ser produzida em uma fermentação separada de *Aspergillus*, e adicionada à mistura de celulase.

Deve ser apreciado que nem toda a β -glicosidase na composição de enzima pode se ligar aos sólidos. Por exemplo, a quantidade de enzima β -glicosidase presente na composição de enzima que compreender um CBD pode ser cerca de 75% a cerca de 100% (p/p), ou qualquer faixa entre estas, ou cerca de 85% a cerca de 100% (p/p), ou qualquer faixa entre estas, ou cerca de 90% a cerca de 100% (p/p), ou qualquer faixa entre estas, da β -glicosidase total presente. Por exemplo, a quantidade de β -glicosidase compreendendo um CDB em relação à quantidade total de β -glicosidase presente na composição de enzima pode ser cerca de 75, 78, 80, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97 ou 100% (p/p).

As enzimas celulase e enzimas β -glicosidase podem ser manipuladas em uma solução aquosa, ou como um pó ou grânulo. As enzimas podem ser adicionadas à pasta fluida aquosa em qualquer ponto antes de sua introdução em um reator de hidrólise. Alternativamente, as enzimas podem ser adicionadas diretamente ao reator de hidrólise, embora a adição de enzimas antes de sua introdução no reator de hidrólise seja preferida para mistura ótima. As enzimas podem ser misturadas na pasta fluida aquosa

usando-se equipamento de mistura que é familiar àqueles versados na técnica.

A Figura 1A é um exemplo não-limitativo de como a hidrólise de celulase pode ser efetuada em um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado conforme descrito acima. Antes da hidrólise de celulase, a pasta fluida de estoque de alimentação aquoso **10** é resfriada. Isto pode ser efetuado usando-se um primeiro trocador de calor **20** que troca corrente de produto de glicose **30**, ou outro fluido adequado. A pasta fluida aquosa **10** pode, em seguida, ser adicionalmente resfriada usando-se um segundo fluido, por exemplo, água fria **45**, no segundo trocador de calor **50**. A pasta fluida **10** pode, em seguida, ser bombeada em um tanque de produção de hidrólise **60**, junto com enzimas celulase e uma enzima β -glicosidase **70** tendo um domínio de ligação de celulose, e amônia **80** para ajustar o pH. Neste exemplo, os teores do tanque de produção de hidrólise **60** são misturados e bombeados para fora do tanque de produção **60**, ao longo do tubo **120**, para um tanque de hidrólise **130**. O tanque de produção **60** pode ser usado para ajustar o pH e alcançar a temperatura desejada da pasta fluida.

Será aparente àqueles versados na técnica que as enzimas podem ser misturadas com a pasta fluida de estoque de alimentação pré-tratado em outra parte, por exemplo, dentro de uma linha que alimenta o tanque de produção **60**, incluindo, mas não limitado a, a montante do primeiro trocador de calor **20**, um ponto entre o primeiro **20** e segundo trocador de calor **50**, ou um ponto imediatamente antes da entrada do estoque de alimentação para o tanque de produção **60**. As enzimas podem também ser adicionadas à pasta fluida de estoque de alimentação lignocelulósica pré-tratado **10** após elas saírem do tanque de produção **60**; por exemplo, elas podem ser adicionadas ao tubo **120**.

Após adição das enzimas, o estoque de alimentação lignocelulósica pré-tratado é submetido à hidrólise parcial. Pelo termo "hidrolisação parcial", entende-se hidrolisação da pasta fluida de estoque de alimentação lignocelulósica pré-tratado de modo que conversão completa do estoque de alimentação em glicose não ocorra. A hidrólise é efetuada de modo que uma

porção da celulose na pasta fluida aquosa permaneça não-convertida. A celulose remanescente é convertida em celobiose, oligômeros de glicose, ou uma combinação destes, durante uma etapa de hidrólise adicional descrita em maiores detalhes abaixo. A hidrólise pode resultar em cerca de 30% a

5 cerca de 80% (p/p), ou cerca de 30% a cerca de 60% (p/p) da celulose sendo convertida em glicose; por exemplo, 30, 33, 35, 38, 40, 43, 45, 50, 53, 55, 58, 60, 70 ou 80% (p/p) da celulose pode ser convertida em glicose. A hidrólise parcial do material lignocelulósico pode ser permitida continuar por cerca de 12 a cerca de 24 horas, ou qualquer quantidade de tempo entre estes.

10 Por exemplo, o tempo de reação pode ser cerca de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 horas, ou qualquer tempo entre estes.

Após a hidrólise parcial ser efetuada, sólidos de fibra não-hidrolisados compreendendo celulose e outros componentes insolúveis produzem fase de sólidos da pasta fluida parcialmente hidrolisada. Os componentes insolúveis, em adição à celulose, que podem estar presentes na fase

15 de sólidos, incluem sólidos não-convertidos que não são digeridos pelas enzimas celulase, bem como componentes não-celulósicos, ou outros materiais que são inertes à celulase, tais como lignina e compostos de sílica. Deve ser apreciado que a fase de sólidos pode compreender licor. A fase de sólidos

20 pode ter um teor de umidade de 40-80%; por exemplo, a fase de sólidos pode ter um teor de umidade de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ou 80%.

A fase aquosa da pasta fluida parcialmente hidrolisada contém glicose que inibe enzimas celulase. Componentes solúveis adicionais que podem estar presentes na fase aquosa incluem oligômeros de glicose, produtos de degradação de açúcar, tais como furfural e hidroxil metil furfural,

25 ácidos orgânicos, tais como ácido acético, e compostos fenólicos derivados de lignina.

Pelo termo "reator de hidrólise" entende-se um vaso de reação usado para efetuar hidrólise da pasta fluida de estoque de alimentação lignocelulósica pré-tratado pelas enzimas celulase e β -glicosidase. O reator de

30 hidrólise pode ser de construção apropriada para acomodar a hidrólise. O reator de hidrólise pode ser revestido com vapor, água quente, ou outra fon-

te de calor, para manter a temperatura desejada. O reator de hidrólise pode ser uma torre com uma razão de altura para diâmetro de mais do que 2:1, ou um tanque com uma razão de altura para diâmetro de 2:1.

5 A hidrólise pode ser efetuada em um reator de hidrólise que é parte de um sistema de hidrólise que compreende um ou mais do que um reator de hidrólise. O termo "sistema de hidrólise" envolve reatores de hidrólise, bem como tanques de alimentação, bombas, e outro equipamento auxiliar. A escolha do número de reatores de hidrólise no sistema de hidrólise depende do custo dos reatores de hidrólise, do volume da pasta fluida aquosa, e outros fatores. Para uma fábrica de etanol de escala comercial, o número típico de reatores de hidrólise é 4 a 12.

15 A hidrólise pode ser efetuada em um "reator de hidrólise de retenção de sólidos". O termo "reator de hidrólise de retenção de sólidos", conforme aqui usado, se refere a um reator de hidrólise que retém sólidos de fibra mais longos do que a fase aquosa da pasta fluida aquosa para aumentar o tempo de reação das enzimas celulase e β -glicosidase com celulose. Um reator de hidrólise de retenção de sólidos pode ser um reator de hidrólise não-misturado no sentido que nenhuma agitação mecânica dos conteúdos do reator é efetuada durante a reação de hidrólise. Um exemplo de um reator de hidrólise não-misturado adequado para a prática da invenção é um reator de fluxo ascendente que é descrito em WO 2006/063467 (Foody *et al*), que é aqui incorporado por referência. O reator de hidrólise de retenção de sólidos pode também ser um reator misturado, em cujo caso agitação mecânica dos conteúdos do reator é efetuada durante a reação de hidrólise.

25 A mistura ativa dentro dos tanques de hidrólise pode ser efetuada por impulsores ou bombas, conforme é bem-conhecido na técnica.

Se o reator de hidrólise de retenção de sólidos for uma torre, ele pode ser uma torre de fluxo ascendente, em que a pasta fluida aquosa e enzimas entram na torre diretamente no fundo da torre, e bombeadas para cima através da torre. Alternativamente, a torre pode ser uma torre de fluxo descendente em que a pasta fluida aquosa é bombeada para baixo através da torre. As torres de fluxo ascendente ou fluxo descendente podem ser

30

não-misturadas. Alternativamente, elas podem ser de mistura em níveis discretos.

Referindo-se agora à Figura 1A, em um exemplo não-limitativo, a pasta fluida hidrolisada compreendendo glicose e sólidos de fibra não-hidrolisados, é removida a partir do topo do reator de hidrólise **130**, via linha **170**, e introduzida em uma unidade de microfiltração **180**. A unidade de microfiltração **180** separa os sólidos de fibra compreendendo celulose da fase aquosa da pasta fluida hidrolisada. Deve ser apreciado por aqueles versados na técnica que os sólidos de fibra compreendem licor arrastado. Estes sólidos de fibra separados (linha **195**) são, em seguida, ressuspensos em um segundo reator de hidrólise **200**, e a hidrólise é permitida continuar.

Conforme descrito anteriormente, durante a hidrólise, as celulases são ligadas à celulose no estoque de alimentação lignocelulósica pré-tratado. A enzima β -glicosidase, que se liga ao estoque de alimentação lignocelulósica pré-tratado, também estará ligada aos sólidos de fibra. Desse modo, quando os sólidos de fibra são separados da fase aquosa da pasta fluida, não somente exocelobio-hidrolases (CHI) e endoglucanases (EG) permanecerão com a fase de sólidos de fibra, mas também β -glicosidase.

Vários métodos podem ser empregados para separar os sólidos de fibra não-hidrolisados a partir da fase aquosa. Estes podem incluir métodos que separam completamente ou quase completamente os sólidos de fibra a partir da fase aquosa, e métodos que somente separam parcialmente os sólidos de fibra a partir da fase aquosa. Por exemplo, os sólidos de fibra podem ser separados a partir da fase aquosa por filtração de membrana, centrifugação, ou filtração de vácuo ou pressão. Um método preferido de filtração de membrana é microfiltração, e um método preferido de centrifugação envolve bombeio da pasta fluida através de um hidroclone.

Um método preferido para efetuar a invenção, que não entende-se para ser limitante, envolve efetuar a hidrólise em um reator de assentamento, conforme descrito em WO 2006/063467 (cujos conteúdos são aqui incorporados por referência). Um exemplo de sistema de hidrólise incorporando reatores de hidrólise de fluxo ascendente é mostrado na Figura 1B. Os

números de referência que são os mesmos como na Figura 1A indicam etapas de processo idênticas. Conforme mostrado na Figura 1B, a pasta fluida aquosa na linha **120** é alimentada ao reator de hidrólise **130**. Esta pode ser por uma linha que vai para baixo através da parte intermediária do reator e, em seguida, adiciona-se a pasta fluida no fundo, através do distribuidor **140**. Alternativamente, a alimentação de pasta fluida pode ser diretamente para o distribuidor **140** no fundo do reator. A pasta fluida aquosa flui para cima através do reator com uma velocidade vertical que é baixa o bastante para permitir que os sólidos de fibra assentem. Como um resultado, a fase aquosa atravessa o reator em um tempo mais curto do que os sólidos de fibra. A celulase e β -glicosidase ligadas permanecem no reator com os sólidos de fibra, enquanto a fase aquosa sai do reator. A β -glicosidase ligada assegura que a celobiose seja convertida em glicose dentro da hidrólise, e não inibe enzimas celulase. Os sólidos não-hidrolisados são transportados para fora do reator junto com a fase aquosa na linha **170**, e são separados a partir da fase aquosa pela unidade de microfiltração **180**.

Os sólidos separados obtidos após uma etapa de separação dos sólidos de fibra a partir do produto de hidrólise compreendendo glicose podem conter cerca de 50% a cerca de 80% de umidade. O teor de umidade depende do processo de separação usado, em cuja extensão se escolhe desidratar os sólidos e a eficiência de remoção de água. Os sólidos separados podem ser lavados com água para aumentar a quantidade de glicose removida.

Após hidrólise em um reator de hidrólise com ou sem retenção de sólidos, os sólidos de fibra são separados, ressuspensos, e a hidrólise continuada. Os sólidos de fibra são ressuspensos em uma fase aquosa que seja compatível para hidrólise adicional da pasta fluida ressuspensa. A solução aquosa usada para ressuspensão dos sólidos é preferivelmente água, embora outras soluções aquosas possam ser usadas. A água pode ser água fresca, água de processo, ou condensado de vapor. A quantidade de solução aquosa adicionada para ressuspensão pode ser a mesma como estava presente na pasta fluida aquosa antes da hidrólise, ou preferivelmente um

tanto menor. A quantidade mínima é aquela requerida para bombear ou transportar e misturar a pasta fluida conforme necessário. A pasta fluida res-suspensa estará livre de glicose e outros inibidores solúveis, ou suas con-centrações significativamente reduzidas. Na ausência de glicose, celobiose e
5 inibidores, ou pela diminuição de sua concentração, a etapa de hidrólise adi-cional pode ser efetuada com eficiência aumentada.

Referindo-se novamente à Figura 1A, a ressuspensão pode ser efetuada pela introdução dos sólidos separados, via linha **195**, para um se-gundo reator de hidrólise **200** junto com água **210** e, em seguida, ressus-pensão dos mesmos para produzir uma pasta fluida ressuspensa. Os sólidos
10 podem ser ressuspensos no líquido a uma concentração de sólidos dentre cerca de 3% e cerca de 30% (p/p), ou qualquer concentração entre estas, por exemplo, de cerca de 10% a cerca de 20% (p/p) de sólidos suspensos, ou qualquer concentração entre estas. A concentração de sólidos suspensos
15 na pasta fluida ressuspensa é preferivelmente a mesma ou um tanto mais alta do que a concentração de sólidos suspensos na pasta fluida de estoque de alimentação pré-tratado antes da separação de sólidos.

Após os sólidos de fibra serem ressuspensos, a hidrólise é per-mitida continuar adicionalmente para converter a celulose em um produto de
20 hidrólise compreendendo glicose. A hidrólise da pasta fluida ressuspensa pode ser permitida proceder por cerca de outras 12-120 horas; por exemplo, a hidrólise da pasta fluida ressuspensa pode ser permitida proceder por cer-ca de 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 90 ou 120 horas. O fundo do
segundo reator de hidrólise **200** pode ser cônico para proporcionar uma tra-jetória em que os sólidos colhidos podem assentar e serem removidos pela
25 bomba **220**, via linha **230**. (Ver Figura 1B). Estes sólidos podem, em segui-da, ser enviados para o processamento de lignina **160**.

Geralmente, o pH da pasta fluida ressuspensa está dentro de uma faixa de cerca de 3,0 a cerca de 7,0, ou qualquer faixa de pH entre es-tas; preferivelmente, o pH está dentro de uma faixa de cerca de 4,5 a cerca
30 de 5,5. Contudo, o pH da solução pode ser mais alto ou mais baixo do que cerca de 4,5 a 5,5 se as enzimas celulase usadas são alcalofílicas ou acido-

fílicas, respectivamente.

A temperatura da solução ressuspensa é ajustada de modo que esteja dentro da faixa ótima para a atividade das enzimas celulase. Geralmente, uma temperatura de cerca de 45°C a cerca de 55°C, ou qualquer
5 temperatura entre estas, é adequada para muitas enzimas celulase. Por exemplo, a temperatura da pasta fluida pode ser ajustada para cerca de 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 ou 55°C. Contudo, a temperatura da solução pode ser mais alta para enzimas celulase termofílicas.

Referindo-se à Figura 1A, a pasta fluida hidrolisada, que compreende glicose na fase aquosa e sólidos não-hidrolisados, e quaisquer partículas contendo celulose não-hidrolisada nos sólidos de fibra, pode ser retirada a partir do topo do segundo reator de hidrólise **200**, via linha **240**, e, em seguida, introduzida em um tanque de assentamento **250**. Os sólidos de fibra assentam no fundo do tanque assentador **250**. A fase aquosa **30** compreendendo glicose pode ser removida via uma bomba. Os sólidos não-hidrolisados podem ser bombeados para fora do tanque assentador **250**, via linha **280**.
10
15

O termo "produto hidrolisado" se refere a produtos produzidos durante a hidrólise enzimática, incluindo, mas não limitados à, glicose que está presente na fase aquosa. Em adição à glicose, a fase aquosa do produto de hidrólise pode também compreender celobiose, oligômeros de glicose, ou uma combinação destes. Quantidades pequenas de celulose não-convertida, bem como materiais não-celulósicos, ou outros materiais que são inertes à celulase, podem ser conduzidos na fase aquosa. Estes sólidos podem ser separados da corrente de glicose para produzir uma preparação que está livre de partículas sólidas.
20
25

Embora o sistema descrito acima empregue dois reatores de hidrólise, o processo pode ser realizado em mais do que dois reatores de hidrólise.

Deve ser apreciado que, após a segunda hidrólise, a pasta fluida hidrolisada resultante pode ser submetida à hidrólise adicional. Isto pode envolver separação da fase de sólidos a partir da pasta fluida hidrolisada, e
30

ressuspensão dos sólidos separados para produzir uma pasta fluida ressuspensa. Estas etapas podem ser repetidas 1 a 5 vezes, ou qualquer número de vezes entre estas, preferivelmente 1 a 2 vezes.

5 Além disso, os sólidos separados podem ser enviados para um ou mais do que um reator de hidrólise a montante e a jusante através das etapas de processamento. Por exemplo, uma primeira porção dos sólidos separados pode ser reciclada para um reator a montante, e uma segunda porção dos sólidos separados pode ser adicionada a um reator a jusante.

10 Uma corrente compreendendo glicose obtida após a etapa de hidrólise parcial pode ser combinada com uma corrente compreendendo glicose obtida a partir da hidrólise continuada da pasta fluida ressuspensa para produzir uma corrente de açúcar combinada. Por exemplo, com referência à Figura 1A, a solução aquosa contendo glicose pode ser removida, via linha **185**, e adicionada à corrente de glicose **30**. Alternativamente, fermentação
15 ou processamento adicional é efetuado separadamente na fase aquosa produzida durante a hidrólise parcial e a hidrólise ressuspensa.

A glicose produzida pela hidrólise de celulose a partir do estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado pode ser fermentada em etanol. A fermentação de glicose e outros açúcares em etanol pode ser realizada por
20 processos convencionais conhecidos àqueles versados na técnica, e pode ser efetuada por uma variedade de microorganismos, incluindo levedura e bactérias, ou microorganismos geneticamente modificados, por exemplo, mas não limitados àqueles descritos em WO 95/13362, WO 97/42307, ou conforme descrito em Alcohol Production From Lignocellulosic Biomass: The
25 logen Process (em: The Alcohol Textbook, Nottingham University Press, 2000), que são aqui incorporados por referência.

A presente invenção será adicionalmente ilustrada nos exemplos seguintes. Contudo, é para ser compreendido que estes exemplos são para propósitos ilustrativos somente, e não devem ser usados de qualquer maneira
30 para limitar o escopo da presente invenção.

Exemplos

Exemplo 1: Hidrólise de estoque de alimentação pré-tratado com enzimas

celulase e β -glicosidase contendo um CBD em um reator de hidrólise de fluxo ascendente

Com referência à Figura 1B, a pasta fluida de estoque de alimentação pré-tratado é preparada de 91 ton/hora de palha de trigo a 20% de
5 umidade. A palha é moída a malha 20 com um moinho de martelo, e cozida com vapor a 230°C, e 3314 kg/hora de ácido sulfúrico 93% (p/p) diluído em 422.000 kg/hora de água de acordo com o ensinamento de Foody, Patente dos Estados Unidos N° 4.461.648. Quando da saída do reator de pré-
10 tratamento, a pasta fluida de estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado **10** é resfriada usando-se um trocador de calor **20** que troca uma corrente de glicose aquosa **30**, ou outro fluido adequado. A pasta fluida de estoque de alimentação pré-tratado **10** é, em seguida, resfriada a uma temperatura de entre cerca de 45°C e cerca de 55°C usando-se um segundo fluido, por exemplo, água fria **45** em um trocador de calor **50**. A pasta fluida de
15 estoque de alimentação pré-tratado **10** é, em seguida, bombeada em um tanque de produção de hidrólise **60**, junto com uma solução aquosa de enzimas **70**, que inclui enzimas celulase a partir do fungo *Trichoderma* a uma dosagem de 19 IU/grama de celulose, e uma enzima β -glicosidase compreendendo um CBD, produzida conforme descrito no Exemplo 5, a uma dosagem de 145 IU/g de celulose. Esta é a alimentação para a torre de hidrólise.
20 Contudo, deve ser notado que as enzimas **70** podem também serem adicionadas; por exemplo, as enzimas **70** podem ser adicionadas dentro de qualquer linha que alimente o reator de hidrólise. Amônia **80** é também adicionada à pasta fluida **10** a uma taxa de 1463 kg/hora imediatamente antes da
25 adição de enzima para ajustar o pH para entre cerca de 4,5 e 5,0. Os conteúdos do tanque de produção de hidrólise **60** são misturados com um agitador **100** e a pasta fluida **10** é, em seguida, bombeada para fora do tanque de produção **60** pela bomba **110**, ao longo do tubo **120**, para um de sete reatores de hidrólise similares, dos quais o reator de hidrólise **130** é um tal reator
30 operado em séries paralelas.

O reator de hidrólise **130** compreende distribuidores **140** para manutenção de uma distribuição uniforme da pasta fluida tratada com enzi-

ma. O reator de hidrólise **130** é um reator de assentamento de fluxo ascendente não-misturado, conforme descrito em WO 2006/063467. O reator é um tanque de diâmetro de 18,29 m (60 pés) e altura de 18,29 (60 pés). A pasta fluida **10** é adicionada ao fundo do reator de hidrólise **130** a uma taxa de 300 gpm e uma concentração de sólidos de fibra de cerca de 10% (p/p). O tanque é cônico para proporcionar uma trajetória na qual os sólidos colhidos assentam, e são removidos pela bomba **142**, via linha **145**. Estes sólidos podem ser enviados para processamento de lignina, via linha **160**, ou recuperados separadamente ou descarregados. A fase aquosa e sólidos de fibra fluem para cima no tanque com os sólidos de fibra assentando e ascendendo o tanque em uma taxa mais lenta do que o líquido.

A pasta fluida sai do tanque após um tempo de residência da fase aquosa de cerca de 72 horas e dos sólidos de fibra, que mantêm uma concentração de 12% (p/p) de cerca de 130 horas. A conversão de celulose é cerca de 95%. A pasta fluida hidrolisada **150**, que compreende uma fase aquosa de 60 g/L de glicose e sólidos de fibra compreendendo principalmente celulose não-hidrolisada, bem como lignina e sílica, é removida a partir do topo do reator de hidrólise **130**, via linha **170**, e introduzida em uma unidade de microfiltração **180** a uma taxa de 300 gpm. A unidade de microfiltração **180** separa os sólidos de fibra compreendendo celulose, lignina e celulase e β -glicosidase ligadas a partir da fase aquosa. A fase aquosa contém pouca enzima com a corrente de glicose, e é removida, via linha **185**, e enviada para fermentação a etanol por levedura. Os sólidos de fibra separados contendo celulase e β -glicosidase ligadas **195** são adequados para serem enviados para um segundo reator de hidrólise para hidrólise adicional.

Exemplo 2: Hidrólise de estoque de alimentação pré-tratado com enzimas celulase e β -glicosidase contendo um CBD em um reator de hidrólise de fluxo ascendente com hidrólise continuada

Este exemplo se refere à hidrólise enzimática de um estoque de alimentação pré-tratado com enzimas celulase e β -glicosidase com um CDB, seguido por separação de sólidos de fibra não-hidrolisados a partir da fase aquosa, e ressuspensão dos sólidos de fibra. Os sólidos de fibra ressuspen-

sos, que contêm a enzima β -glicosidase e enzimas celulase ligadas, são hidrolisados em um segundo reator de hidrólise.

5 A hidrólise de estoque de alimentação pré-tratado com enzimas celulase e enzima β -glicosidase com um CBD é efetuada em um reator de hidrólise de fluxo ascendente, conforme descrito no Exemplo 1. Contudo, neste caso, as dimensões do reator de hidrólise são selecionadas de modo que o líquido saia do tanque após um tempo de residência de cerca de 24 horas, com uma conversão de celulose de cerca de 55% para produzir uma pasta fluida parcialmente hidrolisada **150**. A pasta fluida parcialmente hidrolisada **150**, que compreende uma fase aquosa de 30 g/L de glicose e sólidos de fibra compreendendo celulose principalmente hidrolisada, bem como lignina e sílica, é removida a partir do topo do primeiro reator de hidrólise **130**, via linha **170**, e introduzida em uma unidade de microfiltração **180** a uma taxa de 900 gpm.

15 A unidade de microfiltração **180** separa os sólidos compreendendo celulose, lignina, celulase e β -glicosidase ligadas a partir da fase aquosa da pasta fluida parcialmente hidrolisada. A fase aquosa contém pouca enzima com a corrente de glicose, e é removida, via linha **185**, e adicionada a corrente de glicose **30**. Os sólidos separados **195** contendo celulase e β -glicosidase ligadas, são introduzidos em um segundo reator de hidrólise **200** junto com água **210** para produzir uma pasta fluida ressuspensa e, em seguida, alimentados ao segundo reator de hidrólise **200**, que é também um reator de hidrólise de fluxo ascendente. A taxa de alimentação para o segundo reator é cerca de 450 gpm, e o tempo de residência do líquido é cerca de 48 horas. Similar ao primeiro reator de hidrólise **130**, o fundo do segundo reator de hidrólise **200** é cônico para proporcionar uma trajetória na qual os sólidos colhidos assentam e são removidos pela bomba **220**, via linha **230**. Estes sólidos podem, em seguida, ser enviados para processamento de lignina, via linha **160**, ou removidos separadamente ou descarregados.

30 A glicose, e quaisquer partículas contendo celulose e contendo lignina não-hidrolisadas são, em seguida, retiradas a partir do topo do segundo reator de hidrólise **200**, via linha **240**, e são introduzidas em um tan-

que de assentamento **250**. Os sólidos assentam no fundo do tanque assentador **250**, e a corrente de produto de hidrólise **30** compreendendo glicose é removida, via bomba **260**. Os sólidos assentados são bombeados para fora do tanque assentador **250** pela bomba **270**, via linha **280**. Estes sólidos são, em seguida, enviados para processamento de lignina, via linha **160**. A corrente **30** é enviada para o primeiro trocador de calor, ou para fermentação a etanol por levedura.

Exemplo 3: Hidrólise de celulose por enzima incluindo β -glicosidade com domínio de ligação de celulose (CBD)

10 Este exemplo ilustra a hidrólise de celulose pré-tratada com separação de sólidos e ressuspensão do substrato. O desempenho da hidrólise é melhor com β -glicosidase com um CBD presente do que sem um CBD.

Palha de trigo pré-tratada foi preparada por pré-tratamento contínuo com 0,6% de ácido sulfúrico (p/p), aquecida a 185°C com vapor por 3 minutos. O estoque de alimentação pré-tratado foi lavado com um excesso de água e filtrado a vácuo para remover muito da água. A massa de estoque de alimentação lavada continha 30% de sólidos, e os sólidos continham 51% de celulose, com o restante sendo composto principalmente xilan, lignina e sílica.

20 Duas misturas de enzima celulase de fermentações de cultura submersas em *Trichoderma* foram usadas neste experimento. Ambas misturas continham níveis aumentados de β -glicosidase para assegurar que a celobiose não se acumule durante a hidrólise. O nível de β -glicosidase foi aumentado pelos métodos de White e Hindle, Patente dos Estados Unidos N° 6.015.703. Uma mistura continha 163 g/L de proteína e 131 IU/mL de atividade de celulase de papel de filtro. Esta batelada ("convencional") continha β -glicosidase nativa carecendo de um domínio de ligação de celulose. A atividade de β -glicosidase foi medida pelo ensaio padrão de Ghose (1987) como 1235 IU/mL. Uma segunda batelada (" β g com CBD") continha 32,5 g/L de proteína, 20,7 IU/mL de atividade de celulase de papel de filtro, e 250 IU/mL de atividade de β -glicosidase. O Exemplo 5 descreve a preparação de β -glicosidase com CBD em maiores detalhes.

Hidrólises de celulose foram efetuadas pelo uso de frascos de topo de rosca de 250 mL. O peso de hidrólise total foi 100 g por frasco, com palha de trigo pré-tratada a uma concentração correspondendo a 5% de celulose, enzima adicionada a uma dosagem de 16 a 24 mg de proteína por grama de celulose, e o restante contendo 50 mM de tampão de citrato de sódio, pH 4,8, que continha 0,5% de benzoato de sódio como um conservante. Antes da adição da enzima, o substrato de palha de trigo pré-tratado foi hidratado durante toda a noite no tampão a 50°C com os frascos sacudindo. Durante a hidrólise, os frascos foram sacudidos a 250 rpm em um oscilador giratório a 50°C.

Para hidrólises com filtração e ressuspensão, os frascos foram removidos a partir do oscilador em 24 horas, e os conteúdos filtrados a vácuo sobre papel de filtro de microfibras de vidro. O volume de filtrado foi medido como 40-50 mL, e o filtrado foi substituído por um volume igual de 50 mM de tampão de citrato de sódio, pH 4,8. Similar à hidrólise efetuada antes da filtração e ressuspensão, a hidrólise sacudida foi, em seguida, continuada por 96 horas. Para hidrólises convencionais, os cursos de hidrólise foram efetuados sacudidos por 120 horas sem filtração ou ressuspensão.

Para todas as hidrólises, amostras de 800 µL foram periodicamente tomadas e transferidas em filtros de micro-centrífuga, e centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos para separar os sólidos insolúveis da fase aquosa. O sobrenadante foi recuperado e usado para análise de glicose. Muitas amostras foram verificadas assegurar que a celobiose não se acumule por ebulição por 5 minutos antes da centrifugação.

As concentrações de glicose no sobrenadante foram medidas por um método enzimático. Concentrações de celobiose baixas (<1 g/L) foram confirmadas pela medição em uma HPLC. Um ensaio de celulose baseado na hidrólise com ácido sulfúrico concentrado foi realizado no final de todo curso de hidrólise, e foi confirmada a concentração de celulose não-convertida baseada em medição de glicose.

A Figura 2A mostra os resultados de hidrólise por celulase com β-glicosidase contendo CBD, com dosagens de celulase de 16 mg de prote-

ina por grama de celulose. A hidrólise ressuspensa realiza a hidrólise convencional que foi efetuada sem ressuspensão. A razão é que a filtração da hidrólise após 24 horas remove uma quantidade significativa da glicose presente. Pala remoção da glicose, a inibição do produto final da celulose é removida, e a hidrólise procede a uma taxa mais alta, e alcança um nível mais alto de conversão do que na presença de glicose na hidrólise convencional. A β -glicosidase, que é necessária para uma hidrólise efetiva, é ligada à celulose, e é transportada na hidrólise de ressuspensão.

A Figura 2B mostra um resultado similar conforme a Figura 2A, exceto que a dosagem de enzima é 24 mg/g, ao invés de 16 mg/g na Figura 2A.

A Figura 3 mostra hidrólise com uma celulase convencional, onde a β -glicosidase carece de um CBD. As hidrólises foram efetuadas por 24 horas em dosagens de 16 e 24 mg/g. Neste ponto, as pastas fluidas foram filtradas, e as hidrólises ressuspensas e continuadas. A taxa de hidrólise após ressuspensão é muito baixa, com muito pouca glicose produzida. A razão para esta taxa baixa de hidrólise é que a β -glicosidase carece de um CBD, e não se liga à celulose, mas preferivelmente é perdida para o filtrado durante filtração. A composição de celobiose inibe a celulase e diminui a taxa de hidrólise.

Exemplo 4: Ligação de β -glicosidase com CBD à celulose de palha de trigo lixiviada

β -glicosidase e β -glicosidade contendo um CBD foram purificadas de misturas de celulase totais por cromatografia de troca de ânion, seguida por cromatografia de troca de cátion. As proteínas purificadas foram incubadas com 2,56 g/L de palha de trigo pré-tratada ajustada para pH 4,8 com tampão de citrato de sódio, ou com tampão de citrato somente pH 4,8 por 30 minutos a 4°C ou 50°C. Em seguida à incubação, as amostras foram centrifugadas e as frações de sobrenadante foram analisadas por SDS-PAGE (Figuras 4A e 4B).

Conforme mostrado na Figura 4A, após incubação a 4°C na presença e ausência de palha de trigo pré-tratada, quantidades idênticas de β -

glicosidase foram detectadas no sobrenadante. Isto é identificado pelas faixas a 66 kDa, e indica que a β -glicosidase carecendo de um CBD não se liga à palha de trigo pré-tratada. Em contraste, β -glicosidase purificada-CBD completamente ligada à palha de trigo pré-tratada, e não detectada no sobrenadante, conforme indicado pela faixa a 70 kDa na ausência de palha de trigo pré-tratada. Isto mostra que o CBD é requerido para β -glicosidase para se ligar aos sólidos de fibra. Resultados similares foram observados a 50°C (Figura 4B).

5 Exemplo 5: Expressão de uma fusão de β -glicosidase/CBD em *Trichoderma reesei*

10 Este exemplo descreve o isolamento de DNA genômico de cepa de *Trichoderma reesei* M2C38 e derivados geneticamente modificados, a construção de bibliotecas de DNA genômico, a clonagem de vários genes, construtos genéticos de *Trichoderma reesei* cepa M2C38, e a transformação e expressão de β -glicosidase/construtos genéticos de CBD em *Trichoderma reesei* cepa BTR213.

Cepas de *Trichoderma reesei* M2C38 e BTR213 são cepas prioritárias de Logen Corporation que foram derivadas de *Trichoderma reesei* RutC30 (ATCC 56765, Montenecourt and Eveleigh, *Adv. Chem. Ser.*, 1979, 181:289-301), que foi, por sua vez, derivado de *Trichoderma reesei* Qm6A (ATCC 13631 Mandels and Reese, *J. Bacteriol.*, 1957, 73:269-278).

20 Neste exemplo, endonucleases de restrição, T4 DNA polimerase, T4 DNA ligase e fragmento de Klenow de *E. coli* DNA polimerase 1 foram comprados de Gibco/BRL, New England Biolabs, Boehringer Mannheim ou Pharmacia, e usados conforme recomendado pelo fabricante. Polimerase Pwo com atividade de correção de erros (Boehringer Mannheim) foi usada em todas as reações de cadeia de polimerase (PCR) de acordo com o protocolo do fabricante. Hygromycin B foi comprado de CalBiochem.

25 5.1 Clonagem dos genes *T. reesei* *bgl1*, *cbh1*, *cbh2*, *xln2* e *pgk*

30 Para isolar DNA genômico, 50 mL de Caldo de Dextrose de Batata (Difco) foi inoculado com esporos de *T. reesei* coletados de uma placa Ágar de Dextrose de Batata com um circuito de inoculação estéril. As cultu-

ras foram sacudidas a 200 rpm por 2-3 dias a 28°C. Os micélios foram filtrados em um filtro de microfibras de vidro GFA (Whatman), e lavados com água deionizada fria. As massas de fungo foram congeladas em nitrogênio líquido, trituradas em um pó com um pilão pré-resfriado e pilão; 0,5 g de biomassa em pó foram ressuspensos em 5 mL de Tris a 100 mM, EDTA a 50 mM, pH 7,5, mais 1% de sódio sulfato de dodecila (SDS). O lisato foi centrifugado (5000 g por 20 minutos, 4°C) em fragmentos de célula em pélete. O sobrenadante foi extraído com 1 volume de tampão saturado com fenol (Tris a 10 mM, EDTA a 1 mM, pH 8,0), seguido por extração com 1 volume de tampão-fenol saturado:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) de modo a remover proteínas solúveis. DNA foi precipitado a partir da solução pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio a 3 M, pH 5,2, e 2,5 volumes de etanol frio a 95%. Após incubação por pelo menos 1 hora a -20°C, o DNA foi peletizado por centrifugação (5000 g por 20 minutos, 4°C), enxaguado com 10 mL de etanol a 70%, secado com ar, e ressuspensão em 1 mL de Tris a 10 mM, EDTA de 1 mM, pH 8,0. O RNA foi digerido pela adição de Ribonuclease A (Boehringer Mannheim) adicionado a uma concentração final de 0,1 mg/mL a 37°C por 1 hora. Extrações sequenciais com 1 volume de fenol, saturado com tampão, e 1 volume de fenol saturado com tampão:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram usados para remover a ribonuclease a partir da solução de DNA. O DNA foi novamente precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio a 3 M, pH 5,2, e 2,5 volumes de etanol frio a 95%, peletizado por centrifugação, enxaguado com etanol a 70%, secado com ar, e ressuspensão em 50 µl de Tris a 10 mM, 1 mM de EDTA, pH 8,0. A concentração de DNA foi determinada pela medição da absorvância da solução a 260 nm (p. C1 em Sambrook, Fritsch and Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Press 1989, daqui por diante referido como Sambrook *et al.*).

Duas bibliotecas de plasmídeo e uma biblioteca de fago foram construídas usando-se DNA genômico isolado de cepa de *T. reesei* M2C38. As bibliotecas de plasmídeo foram construídas no vetor pUC119 (Viera and Messing, "Isolation of single-stranded plasmid DNA", Methods Enzymol.,

153:3, 1987), conforme se segue: 10 µg de DNA genômico foi digerido por 20 horas a 37°C em 100 µL de volume com 2 unidades/µg de enzimas de restrição *Hind*III, *Bam*H1 ou *Eco*R1. O DNA digerido foi fracionado em um gel de agarose a 0,75% operando em Tris-acetato a 0,04M, EDTA a 1 mM, e
5 manchado com brometo de etídio. Fatias de gel correspondentes ao tamanho dos genes de interesse (baseado na informação publicada e manchas de Southern) foram cortadas e submetidas à eletroeluição para recuperar fragmentos de DNA (Sambrook *et al.*, pp. 6.28-6.29). Estas frações enriquecidas de DNA foram ligadas em pUC119 de modo a criar bibliotecas de gene
10 em reações de ligação contendo 20-50 µg/mL de DNA em uma razão molar de 2:1 de vetor:DNA de inserto, ATP a 1 mM e 5 unidades de T4 DNA ligase em um volume total de 10-15 µl a 4°C por 16 horas. A cepa de *Escherichia coli* HB101 foi eletroporada com as reações de ligação usando-se o Cell Poro-
rator System (Gibco/BRL), seguindo-se o protocolo do fabricante e transformantes selecionados em LB ágar contendo 70 µg/mL de ampicilina.
15

Transformantes de *E. coli* HB101 abrigando clones *cbh1*, *cbh2* ou *bgl1* a partir das bibliotecas pUC119-*Hind* III, -*Bam*H1 ou -*Eco*R1 recombinantes foram identificados por hibridização de elevação de colônia: 1,3 x 10⁴ colônias foram transferidas nas membranas de náilon HyBond® (Amersham); as membranas foram colocadas no lado da colônia em papel de
20 manchamento (VWR 238), saturadas com NaOH a 0,5 M, NaCl a 1 M por 5 minutos para lisar as células bacteriais e desnaturar o DNA: as membranas foram, em seguida, neutralizadas pela colocação das mesmas no lado da colônia em papel de manchamento (VWR 238), saturadas com Tris a 1,5 M,
25 pH 7,5, mais NaCl a 1 M por 5 minutos; as membranas foram permitidas secar com ar por 30 minutos, e o DNA foi, em seguida, fixado às membranas por cozimento a 80°C por 2 horas.

Sondas etiquetadas ³²P foram preparadas por amplificação de PCR de fragmentos curtos (0,7-1,5 kB) das regiões de codificação *bgl1*, *cbh1* e *cbh2* a partir da reunião enriquecida de fragmentos *Hind*III, *Bam*H1 ou
30 *Eco*R1, respectivamente, em uma reação de etiquetagem contendo 10-50 DNA-alvo, d(GCT)TP a 0,2 mM cada, dATP a 0,5 µM, α-³²P-dATP a 20-40

5 μCi , 10 pmol de iniciadores de oligonucleotídeo e 0,5 unidade de Taq polimerase em um volume total de 20 μL . A reação foi submetida a 6-7 ciclos de amplificação (95°C, 2 minutos; 56°C, 1,5 minuto; 70°C, 5 minutos). O DNA etiquetado ^{32}P amplificado foi precipitado pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) e 0,5 mg de tRNA de levedura. O DNA foi peletizado por microcentrifugação, lavado duas vezes com 1 mL de etanola 70%, secado com ar, e ressuspenso em TRis a 1M pH 7,5, EDTA a 1 mM.

10 Membranas de náilon nas quais os plasmídeos pUC119 recombinantes tinham sido fixados foram hidrolisadas em sacos vedados por calor por 1 hora a 60-65°C em NaCl a 1 M, 1% de SDS, Tris a 50 mM, EDTA a 1 mM, pH 7,5, com 100 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de esperma de salmão cisalhado desnaturado. Hibridizações foram realizadas em sacos vedados com calor no mesmo tampão com somente 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de esperma de salmão cisalhado desnaturado, e $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ cpm de sonda *blg1*, *cbh1* ou *cbh2*
15 desnaturada por 16-20 horas a 60-65°C. As membranas foram lavadas uma vez por 15 minutos com NaCl a 1 M, 0,5% de SDS a 60°C, duas vezes por 15 minutos cada com NaCl a 0,3 M, 0,5% de SDS a 60°C, e uma vez por 15 minutos com NaCl a 0,03 M, 0,5% de SDS a 55°C. As membranas foram novamente colocadas em sacos vedados com calor e expostas a filme de
20 raios X Kodak RP por 16-48 horas a -70°C. O filme de raios X foi desenvolvido seguindo os protocolos do fabricante. Colônias dando sinais forte ou fraco foram captadas e cultivadas em meio 2 x YT, suplementado com 70 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. O DNA de plasmídeo foi isolado a partir destas culturas usando-se o método de lise alcalina (Sambrook, et al., pp. 1.25-1.28), e analisado por digestão de restrição. Hibridização de Southern (Sambrook, et al.,
25 pp. 9.38-9.44) e análise de PCR (Sambrook, et al., pp. 14.18-14.19).

30 Clones conduzindo o gene *blg1* foram identificados por hibridização de elevação de colônia da biblioteca pUC119-*Hind* com um 1,0 de uma sonda *blg1* preparada usando-se iniciadores de oligonucleotídeos designados para amplificar bp 462-1403 da sequência *blg1* publicada (Barnett, Berka, and Fowler, em "Cloning and Amplification of the Gene Encoding na Extracellular β -glicosidase de *Trichoderma reesei*: Evidence for Improved Rates

of Saccharification of Cellulosic Substrates" Bio/Technology, Volume 9, Junho de 1991, p. 562-567, aqui referido como "Barnett, *et al.*"). Um clone *bgl1*, pJEN200, foi isolado contendo 6,0 kb de fragmento *Hind* III correspondente ao promotor, gene estrutural e sequências de terminação. Clones conduzindo o gene *cbh1* foram identificados pela hibridização de elevação de colônia da biblioteca pUC119-*Bam*H1 com 0,7 kb de uma sonda *cbh1* preparada usando-se iniciadores de oligonucleotídeo para amplificar bp 597-1361 da sequência de *cbh1* publicada (Shoemaker, Schweikart, Landner, Gelfand, Kwok, Myambo and Innis, "Molecular cloning of exo-cellobiohydrolyase 1 derived from *Trichoderma reesei* strain L27", Bio/Technology 1: 691-696, 1983 daqui por diante referido como Shoemaker *et al.*). Um clone *cbh1*, pCOR132, foi isolado contendo 5,7 kb de fragmento *Bam*H1 correspondente ao promotor (4,7 kb) e 1 kb do gene estrutural *cbh1*. A partir deste, um fragmento de 2,5 kb de *Eco*R1 contendo o promotor de *cbh1* (2,1 kb) e 5' terminal da região de codificação *cbh1* (0,4 kb) foi subclonado em pUC119 para gerar pCB152. Clones conduzindo o gene *cbh2* foram identificados por hibridização de elevação de colônia da biblioteca pUC119-*Eco*R1 com uma 1,5 kb de sonda *cbh2* preparada usando-se iniciadores de oligonucleotídeo designados para amplificar bp 580-2114 da sequência de *cbh2* publicada (Chen, Gritzali and Stafford, "Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*", Bio/Technology 5: 274-278, 1987, daqui por diante referido como Chen *et al.*). Um clone *cbh2*, pZUK600, foi isolado contendo 4,8 kb de fragmento *Eco*R1 correspondente ao promotor (600 bp), gene estrutural (2,4 kb), e terminador (1,9 kbp).

Uma biblioteca de fago foi construída em vetor lâmbda λ DASH (Stratagene, Inc.) conforme segue: DNA genômico (3 μ g) foi digerido com 2,1, 0,5 e 0,5 unidade/ μ g de *Bam* HI por 1 hora a 37°C para gerar fragmentos de 9-23 kB de tamanho. O DNA de cada digestão foi purificado por extração com 1 volume de Tris:fenol saturado:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguido por precipitação com 10 μ l de acetato de sódio a 3 M, pH 5,2, e 250 μ l de etanol a 95% (-20°C). O DNA digerido foi peletizado por microcentrifugação, enxaguado com 0,5 mL de etanol frio a 70%, secado com

ar, e ressuspenso em 10 µl de água deionizada estéril. O enriquecimento de fragmentos de DNA de 9-23 kb em tamanho foi confirmado por eletroforese de gel de agarose (0,8% de agarose em Tris-acetato a 0,04 M, EDTA a 1 mM). O DNA digerido (0,4 µg) foi ligado a braços de 1 µg de λDASH pré-digeridos com *Bam*HI (Stratagene) em uma reação contendo 2 unidades de T4 DNA ligase e 1 mM de ATP em um volume total de 5 µl a 4°C durante toda a noite. A mistura de ligação foi acondicionada nas partículas de fago usando-se os extratos de acondicionamento GigaPack® II Gold (Stratagene), seguindo-se os protocolos do fabricante. A biblioteca foi titulada usando-se o hospedeiro *E. coli* cepa XL-1-Blue MRA (P2), e verificado conter 3 x 10⁵ clones independentes.

Sondas etiquetadas Digoxigen-11-dUTP foram preparadas de regiões de codificação amplificadas de PCR dos genes *cbh1*, *xln2* e *pgk* por etiquetagem de primer aleatório usando-se o kit de Etiquetagem e Detecção DIG (Boehringer Mannheim), e seguindo os protocolos do fabricante. Clones genômicos contendo os genes *cbh1*, *xln2* e *pgk* foram identificados por hibridização de elevação de placa da biblioteca λDACH. Para cada gene de interesse, 1 x 10⁴ clones foram transferidos para membranas de náilon Nytran® (Schleicher e Schull). As partículas de fago foram lisadas, e o DNA do fago desnaturado pela colocação da placa das membranas no lado do papel de manchamento (VWR 238), saturada com NaOH a 0,5 M, NaCl a 1 M por 5 minutos; as membranas foram, em seguida, neutralizadas pela colocação das mesmas na placa no lado do papel de manchamento (VWR 238), saturada com Tris a 1,5 M, pH 7,5, mais NaCl por 5 minutos; as membranas foram permitidas secar com ar por 30 minutos, e o DNA foi, em seguida, fixado às membranas por cozimento a 80°C por 2 horas. As membranas foram pré-hibridizadas em sacos vedados com calor em uma solução de 6 X SSPE, 5X Denhardt's, 1% de SDS, mais 100 µl/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado, cisalhado a 65°C por 2 horas. As membranas foram, em seguida, hibridizadas em sacos vedados com calor na mesma solução contendo 50 µl/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado, cisalhado, e 0,5 µg de sondas etiquetadas digoxigen-dUTP a 65°C durante toda a noite. As

membranas foram lavadas duas vezes por 15 minutos em 2X SSPE, 0,1% de SDS à temperatura ambiente, duas vezes por 15 minutos em 0,2X SSPE, 0,1% de SDS a 65°C, e uma vez por 5 minutos em 2X SSPE. Clones de hibridização positiva foram identificados por reação com um conjugado de anticorpo antidigoxigenante/fosfatase alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfatase e 4-cloreto de azul de 4-nitrotetrazólo (Boehringer Mannheim), seguindo-se o protocolo do fabricante. Clones de hibridização positiva foram purificados adicionalmente por uma segunda etapa de classificação com as sondas etiquetadas digoxigen-dUTP. Clones individuais foram isolados, e o DNA do fago purificado conforme descrito em Sambrook *et al.* (1998) pp. 2.118-2.121, com a exceção que a etapa de gradiente de CsCl foi substituída por extração com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio a 3 M, pH 5,2, e 2,5 volumes de etanol frio a 95%. O DNA do fago precipitado foi lavado com 0,5 mL de etanol frio a 70%, e secado com ar e ressuspenso em 50 µl de TRis a 10 mM, EDTA a 1 mM, pH 8,0. Os fragmentos de restrição contendo os genes de interesse foram identificados por digestões de restrição do DNA do fago purificado e hibridização de mancha de Southern (Sambrook, *et al.*, pp, 9.38-9.44), usando-se as mesmas sondas etiquetadas digoxigen-dUTP usadas para classificar a biblioteca λDASH. AS membranas foram hibridizadas e fragmentos de hibridização positiva visualizados pelos mesmos métodos usados para as elevações de placa. Uma vez que os fragmentos de restrição desejados de cada clone de λDASH foram identificados, as digestões de restrição foram repetidas, os fragmentos foram decompostos em um gel de agarose a 0,08% em TAE, e as faixas desejadas cortadas. O DNA foi eluído a partir das fatias de gel usando-se o Kit Sephaglas BandPrep (Pharmacia) seguindo-se o protocolo do fabricante.

Clones conduzindo o gene *cbh1* foram identificados por hibridização de elevação de colônia da biblioteca λDASH (exemplo 2) com uma sonda *cbh1* compreendendo bp 45-222 da sequência de *cbh1* publicada (Shoemaker *et al.*). Um fragmento *Bam*HI de 1,8 kb contendo o terminal 3'

da região de codificação de *cbh1* (0,5 kb) e o terminador de *cbh1* (1,3 kb) foi isolado por digestão de restrição de DNA do fago purificado de um clone *cbh1* λ DASH. Este fragmento foi subclonado no local de *Bam*H1 do vetor de plasmídeo de *E. coli* pUC119 para gerar o plasmídeo pCB1Ta. Os clones

5 conduzindo o gene *xln2* foram identificados por hibridização de elevação de colônia da biblioteca λ DASH (exemplo 2) com uma sonda de *xln2* compreendendo bp 100-783 da sequência de *xln2* publicada (Saarelainen, Polaheimo, Fagrestrom, Suominen and Nevalainen, "Cloning, sequencing and enhanced expression of the *Trichoderma reesei* endoxylanase II (p19) gene

10 *xln2*", Mol. Gen. Genet. 241:497-503, 1993, daqui por diante referido como Saarelainen *et al.*). Um fragmento de 5,7 kb de *Kpn*1 contendo o promotor (2,3 kb), região de codificação (0,8 kb) e terminador (2,6 kb), o gene *xln2* foi isolado por digestão de restrição de DNA do fago purificado de um clone *xln2* λ DASH. Este fragmento foi subclonado no local de *Kpn*1 de pUC119

15 para gerar o plasmídeo pXYN2K-2. Os clones conduzindo o gene *pgk* foram identificados por hibridização de elevação de colônia da biblioteca λ DASH (exemplo 2) com uma sonda *pgk1* compreendendo bp 4-1586 a sequência de *pgk* publicada (Vanhanem, Penttila, Lehtovaara and Knowles, "Isolation and characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*pgk*) de fungo

20 filamentoso de *Trichoderma reesei*", Curr. Genet. 15:181-186, 1989). Um fragmento de 5,0 kb de *Eco*R1 contendo o promotor (2,9 kb), região de codificação (1,6 kb), e terminador (0,5 kb), o gene *pgk* foi isolado por digestão reversa de DNA do fago purificado de um clone *pgk* λ DASH. Este fragmento foi subclonado no local de *Eco*R1 de pUC119 para gerar o plasmídeo

25 pGK5.0.

5.2 Construção de vetor de sobre-expressão de β -glicosidase pC/XBG-CBD-TV

Este exemplo descreve a construção de um vetor designado para expressar uma proteína de fusão da região de codificação de β -glicosidase matura, e um peptídeo compreendendo o domínio de ligação de

30 celulose ligante de *Trichoderma celobio*-hidrolase I. Neste construto, a expressão da proteína de fusão é dirigida pelo promotor de *Trichoderma celo*-

bio-hidrolase I (*cbh1*) e peptídeo de sinal de secreção de xilanase 2 (*xln2*).

Na região de codificação de β -glicosidase menos o resíduo de alanina de terminal C (bp 474-2679) foi amplificada com *Pwo* polimerase a partir do clone *bgl1* genômico pJEN200 usando-se iniciadores para inserir
5 um local de *Xba1* diretamente a montante de bp 474 na sequência de *bgl1* publicada (Barnett *et al*) e um local de *Kpn1* em bp 2676, que é um códon fora do códon de parada. Este fragmento amplificado foi subclonado sem digestão no local de *Sma1* de pUC19 para gerar o plasmídeo *pBgns1*. O fragmento *bgl1* que carece do códon de parada foi liberado a partir do
10 *pBgns1* por digestão com *Xba1* e *Kpn1* e inserido no pCB219N digerido com *Xba1* e *Kpn1* para gerar *pBgns2*. Para produzir pCB219N, um fragmento de terminador *cbn2* foi amplificado a partir do gabarito pZUK600 usando-se um homólogo de primer para bp 2226-2242 da região 3'-não-transladada publicada do gene *cbn2* (Chem *et al.*, 1987) contendo um local *Kpn1* no terminal
15 5' e o primer de avanço pUC (Cat. N° 1224, New England Biolabs) que se fortalece a jusante do local *EcoR1* no terminal 3' em pZUK600. Este fragmento foi digerido nos locais projetados *Lpn1* e *EcoR1*, e inserido nos locais correspondentes de pUC119 para gerar pCB219. Um adaptador de *EcoR1* (Cat. N° 35310-010.Gibco/BRL) foi inserido no local único de *EcoR1* de
20 pCB219 para gerar pCB219N.

Um fragmento de 2,3 kb contendo o promotor e sinal de secreção do gene *xln2* (bp-2150 a +99 onde + 1 indica o códon de partida de ATG) foi amplificado com *Pwo* polimerase a partir do subclone *xln2* genômico pXYN2K-2 usando-se um primer específico de *xln2* contendo o local de
25 *Nhe1* diretamente a jusante de bp102 da sequência de *xln2* publicada (Saarelainen *et al*) e o primer reverso de pUC (Cat. N° 18432-013.Gibco/BRL) que se fortalece a jusante do local *EcoR1* no terminal 5' do gene *xln2*. Este produto de PCR *xln2* foi digerido com *EcoR1* (que foi amplificado como parte do poliligante pUC119 de pXYN2K-2) e *Nhe1*, e inserido no plasmídeo pBR322L, que foi preparado a partir do plasmídeo pBE322 por inserção de
30 um ligante *Sph1-Not1-Sal1* entre os locais *Sph1* e *Sal1*. O *EcoR1* no terminal 5' do promotor de *xln2* no plasmídeo resultante pBR322LXN foi, em se-

guida, agrupado com ligantees Klenov e *Spe1* (Cat. N° 1086. New England Biolabs), foram adicionados para gerar pBR322pXN. Um fragmento *HindIII* de 1,2 kb compreendendo bp-1399 a 204 do promotor de *cbh1* foi isolado por digestão de *HindIII* do subclone genômico pCB152. Este fragmento foi
5 usado para reduzir o fragmento de *HindIII* compreendendo bp 1400 a bp 121 do promotor de *xln2* no vetor pBR322pXN para gerar o plasmídeo pBR322C/X.

O plasmídeo pBgns2 foi cortado com *Xba1* e *Not1* e um fragmento de 4,2 bp, contendo a região de codificação de *bgl1* que carece do
10 códon de parada, seguido pelo terminador de *cbh2* foi isolado. Este fragmento foi inserido no plasmídeo pBR322CYX com *Nhe1* e *Not1* (*Nhe1* e *Xba1* têm projeções compatíveis). Esta clonagem resultante em um cassete de expressão do qual a β -glicosidase matura carecendo de códon de parada pode ser expressa sob o controle do promotor de *cbh1* e o peptídeo de sinal
15 de secreção de *xln2*. Este plasmídeo de cassete de expressão é pC/XBgns, e tem um local único de *Kpn1* entre a região de codificação de *bgl1* e o terminador de *cbh2*.

Para obter o ligante de *cbh1* e região de CBD, um fragmento de DNA compreendendo bp 1665 a bp 1882 do gene *cbh1* publicado (Shoemaker
20 *et al*) foi amplificado por PCR usando iniciadores para inserir *Kpn1* e *Spe1* em ambos terminal 5' e um local de *Kpn1* no terminal 3' do fragmento. O local 5' *Kpn1* está localizado de modo a produzir uma fusão precisa entre a estrutura de leitura entre a região de codificação de *bgl1* em pC/XBgns e a estrutura de leitura do ligante de *cbh1* + CBD. O local 3' *Kpn1* está localizado
25 imediatamente após o códon de parada da região de codificação de *cbh1* nativa. Este produto de PCR de 215 bp foi digerido com *Kpn1* e inserido no local único de *Kpn1* de pC/XBgns, para produzir o plasmídeo de cassete de expressão final pC/XBg-CBD. Como um resultado da inserção dos locais de
30 reação, a proteína de fusão final expressa por este construto conterà três aminoácidos extras (Pro-Thr-Ser) entre Val713 da sequência de codificação de *bgl1* e o Ile474 da região de codificação de *cbh1*.

O gene *E. coli* de higromicina fosfotransferase (*hph*) usado como

um marcador selecionável para *T. reesei* foi amplificado com *Pwo* polimerase a partir do plasmídeo pVU1005 (Van den Elzen, Townsend, Lee and Bedbrook, "A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells", Plant Mol. Biol. 5:299-302, 1989). Os iniciadores foram designados para introduzir locais de *Sph1* e *Kpn1* nos terminais 5' e 3' da região de codificação de *hph* (bp 211-1236 da sequência de *hph* publicada, Gritz e Davies, "Plamid-encoded hygromycin b resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae" Gene 25: 179-188, 1983), respectivamente. O produto de PCR foi digerido com *Sph1* e *Kpn1*, e inserido nos locais correspondentes na região poliligante de pUC119. O plasmídeo resultante, pHPT100, foi usado como o plasmídeo de partida para a construção do cassete de seleção. Duas novas regiões ligantes foram introduzidas neste plasmídeo para facilitar a inserção dos fragmentos do promotor e terminador requeridos para expressar o gene *hpn* em um hospedeiro de *Trichoderma*. Um ligante *HindIII-XbaI-XhoI-SphI* foi inserido entre os locais *HindIII* e *SphI* no terminal 5' da sequência de *hph* e um ligante de *KpnI-NotI-SacI* que foi inserido entre os locais de *KpnI* e *SacI* no terminal 3' da sequência de *hph*. Este construto foi designado como pHPT102. Os iniciadores usados para amplificar o promotor de *pgk* (Vanhanen, Saloheimo, Ilmen, Knowles and Penttila. "Promoter structure and expression of the 3-phosphoglycerate gene (*pgk1*) of *Trichoderma reesei*". Gene 106: 129-133, 1991) foram designados para introduzir um local de *XhoI* e um local de *SphI* nas posições -970 + 1 do promotor respectivamente. Estes locais foram subsequentemente usados para inserir o promotor de *pgk* nos locais *XhoI* e *SphI* de pHPT102 para gerar pHPT115. Um fragmento de terminador de *cbh1* de 1,3 kb foi amplificado com *Pwo* polimerase de pCB1Ta usando um primer que fortalece a região 3' não-transladada de *cbh1* (bp 1864-1899 da sequência de *cbh1* publicada) contendo um local de *KpnI* em bp 1877-1882 e o primer reverso pUC (Cat. N°. 18432-013. Gibco/BRL) que se fortalece a jusante do local de *EcoRI* no terminal 3' do terminador de *cbh1* em pCB1Ta. O produto de PCR de terminador de *cbh1* foi digerido com *KpnI* e inserido no local único de *KpnI* de pHPT115, para gerar o plasmídeo de cassete de seleção pHPT1136.

Para produzir o vetor de transformação, o cassete de expressão de 5,8 kb compreendendo uma região 5' distal do promotor de *xln2*, bp-1399 a 204 do promotor de *cbh1*, bp-121 a +99 do promotor de *xln2* e peptídeo de sinal de secreção, a região de codificação para a β -glicosidase/fusão de CBD, e o terminador de *cbh2* foi isolado de pC/XBg-CBD por digestão com *Not1*, agrupamento do local *Not1* com Klenow DNA polimerase, e digestão com *Spe1*. Este fragmento de *Spe1/Not1* de 5,8 kb foi inserido entre o único cassete de secreção de *hph* de pHPT136 a montante que tinha sido digerido com *Xho1*, agrupado com Klenov DNA polimerase e digerido com *Xba1* (*Spe1* e *Xba1* têm projeções compatíveis). O vetor de transformação final, pC/XBg-CBD-TV, foi linearizado no local único de *Not1* no terminal 3' do terminador de *cbh1* no cassete de seleção de *hph*, e introduzido como um vetor linear em *T. reesei* BTR213, via bombardeio de microprojétil conforme descrito abaixo.

5.3 Transformação de *T. reesei* BTR213 via bombardeio de microprojétil

O sistema Biolistic PDS-1000/He (BioRad; E. I. DuPont de Nemours and Company) foi usado para transformar esporos de cepa de *T. reesei* BTR213, e todos os procedimentos foram realizados conforme recomendado pelo fabricante. Partículas de tungstênio M-10 (diâmetro médio de 0,7 μ m) foram usadas como microtransportadores. Os seguintes parâmetros foram usados na otimização da transformação: uma pressão de ruptura de 7584,23 KPa (1100 psi), uma pressão de hélio de 29 mm Hg, uma distância de folga de 0,95 cm, uma distância de curso de macrotransportador de 16 mm, e uma distância alvo de 9 cm. Placas foram preparadas com 1×10^6 esporos de meio Ágar de Dextrose de Batata (PDA). As placas bombardeadas foram incubadas a 28°C. Quatro horas de pós-bombardeio, os esporos são submetidos à seleção primária pelo revestimento de meio de PDA seletivo suplementado com 40 unidades/mL de HygB. As placas de bombardeio são incubadas a 28°C. Os transformantes podem ser observados após 3-6 dias de crescimento; contudo, incubação adicional é necessária para alcançar esporulação.

Após a esporulação ter ocorrido, um processo de seleção secundária é realizado para isolar os transformantes individuais. Os esporos são coletados da placa com um circuito de inoculação e ressuspensos em

água estéril. Esta suspensão é, em seguida, filtrada através de uma seringa estéril tampada com microfibras de vidro. Isto permite a passagem de esporos, enquanto retém micélios indesejados. Uma determinação da concentração de esporos nesta suspensão é requerida, e diluições subsequentes são colocadas nas placas de PDA suplementadas com 0,75% de Oxgall (Difco) e HygB (20 unidades/mL) para obter 20-50 esporos por placa. O Oxgall age como um restritor de colônia, permitindo, desse modo, o isolamento de colônias individuais nestas placas de seleção secundárias. As colônias isoladas podem ser observadas após 2-3 dias.

10 5.4 Produção de β -glicosidase em culturas líquidas

Colônias individuais de *Trichoderma* são transferidas para placas de PDA para a propagação de cada cultura. Esporulação é necessária para a inoculação uniforme de frascos de sacudir que são usados no teste da capacidade da cultura produzir a β -glicosidase e celulase. O meio de cultura é composto do seguinte:

Tabela 2: Componentes do meio de cultura

Componente	Concentração
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,35 g/L
KH_2PO_4	4,00 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,02 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,53 g/L
Licor Excessivo de Milho	6,25 g/L
CaCO_3	10,00 g/L
Fontes de carbono**	5-10 g/L
Elementos de traço*	1 mL/L

*A solução de elementos de traço contém 5 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,4 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

**5 g/L de glicose mais 10 g/L de floco Solka (quando o *cbh1* ou outro promotor de celulase é usado). 10 g/L de xylan (quando o promotor de *xln2* é usado), ou outra fonte de carbono compatível com o promotor direcionando a expressão da β -glicosidase. A fonte de carbono pode ser esterilizada separadamente como uma solução aquosa em pH 2, e adicionada ao meio

remanescente.

O volume líquido por frasco de 1 litro é 150 mL, o pH inicial é 5,5, e cada frasco é esterilizado por autoclave de vapor por 30 minutos a 121°C antes da inoculação.

5 Para ambas as células nativas e transformadas, os esporos são isolados das placas de PDA conforme descrito na Seção 5.3 acima, e $1-2 \times 10^6$ esporos são usados para inocular cada frasco. Os frascos são sacudidos a 200 rpm a uma temperatura de 28°C por um período de 6 dias. O filtrado contendo a proteína secretada foi coletado por filtração através de filtros de
10 microfibra de vidro GF/A (Whatman). A concentração de proteína é determinada usando-se o Ensaio de Proteína Bio-Rad (Cat. N° 500-0001) usando-se *Trichoderma* celulase como um padrão. A atividade de β -glicosidase é determinada conforme descrito em Ghose, 1987.

15 *5.5 Produção de β -glicosidase por cepas de T. reesei BTR213 e 1059 usando-se fonte de carbono de floco Solka*

A cepa nativa BTR213 e a cepa transformada a partir deste hospedeiro 1059A foram cultivadas usando-se os procedimentos do Exemplo 5D com 10 g/L de floco Solka e 5 g/L de glicose como fontes de carbono. Os resultados são mostrados na tabela 2.

20 A cepa nativa produziu 0,19 IU de β -glicosidase por mg de proteína.

O transformante 1059A que expressa a β -glicosidase/fusão de CBD a partir do promotor de *cbh1* e sinal de secreção de *xln2* produziu 7,6 IU/mg de β -glicosidase. Isto representa um aumento de 40 vezes sobre a
25 cepa nativa, que representa a vasta maioria da β -glicosidase.

Tabela 3: Produção de atividade de β -glicosidase de cepas de *T. reesei* BTR213 e 1059A em culturas com frasco de 150 mL

Cepa	Promotor	Sinal de secreção	β -glicosidase Nativa	β -glicosidase (IU/mg)
RutC30	<i>bgl1</i>	<i>bgl1</i>	Nativa	0,14
RC-320	<i>cbh1</i>	<i>xln2</i>	Fusão de β -G/CBD	19

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de enzima para a hidrólise enzimática de celulose para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose a partir de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, a composição de enzima compreendendo enzimas celulase, uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase e um agente de ligação para ligação da enzima β -glicosidase ao estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, no qual a hidrólise é efetuada por:

(i) hidrolisação parcial de uma pasta fluida aquosa do estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado com a composição de enzima para produzir uma pasta fluida hidrosilada compreendendo glicose, oligômeros de glicose, ou uma combinação destes, e sólidos de fibra não-hidrosilados compreendendo celulose e lignina;

(ii) separação dos sólidos de fibra não-hidrosilados a partir da pasta fluida hidrosilada para produzir sólidos de fibra separados, no qual as enzimas celulase e a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase se ligam aos sólidos de fibra separados;

(iii) ressuspensão dos sólidos de fibra separados em uma solução aquosa para produzir uma pasta fluida ressuspensa; e

(iv) continuação da hidrólise da pasta fluida ressuspensa para produzir o produto de hidrólise compreendendo glicose.

2. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 1, na qual o agente de ligação é um módulo de ligação de carboidrato operavelmente ligado a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase.

3. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 2, na qual o módulo de ligação de carboidrato é um domínio de ligação de celulose.

4. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 1, na qual as enzimas celulase são produzidas por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas.

5. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 4, na qual as enzimas celulase são produzidas por *Trichoderma*.

6. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 1, na qual a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase é produzida por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas.

5 7. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 6, na qual a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase é produzida por *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

8. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 3, na qual o domínio de ligação de celulose é um domínio de ligação de celulose de Família I.

9. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 3, na qual o domínio de ligação de celulose é um domínio de ligação de celulose bacteriana ou fúngica.

10. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 3, na qual a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase compreende um ligante que liga operavelmente o domínio de ligação de celulose à enzima β -glicosidase.

11. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 1, na qual a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase está ocorrendo naturalmente.

12. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 1, na qual a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase é uma proteína de fusão geneticamente modificada.

13. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 3, na qual cerca de 75% a cerca de 100% (p/p) da enzima β -glicosidase total presentes na composição de enzima compreendem um domínio de ligação de celulose.

14. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 13, na qual cerca de 90% a cerca de 100% (p/p) da enzima β -glicosidase total presentes na composição de enzima compreendem um domínio de ligação de celulose.

15. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 1, na

qual as enzimas celulase compreendem uma enzima celobio-hidrolase selecionada a partir do grupo consistindo em enzimas celulase CBHI e CBHII, e combinações destas, e uma enzima endoglucanase selecionada a partir do grupo consistindo em enzimas celulase EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV, e combinações destas.

16. Composição de enzima, de acordo com a reivindicação 1, na qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), cerca de 75% a cerca de 100% (p/p) das enzimas celulase totais presentes na composição de enzima se ligam aos sólidos de fibra presentes na pasta fluida aquosa.

17. Uso de uma composição de enzima para a hidrólise enzimática de celulose para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose a partir de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, a composição de enzima compreendendo enzimas celulase, uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase e um agente de ligação para ligação da enzima β -glicosidase ao estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, na qual o uso da composição de enzima compreende:

(i) hidrolisação parcial de uma pasta fluida aquosa do estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado com a composição de enzima para produzir uma pasta fluida hidrosilada compreendendo glicose, oligômeros de glicose, ou uma combinação destes, e sólidos de fibra não-hidrosilados compreendendo celulose e lignina;

(ii) separação dos sólidos de fibra não-hidrosilados a partir da pasta fluida hidrosilada para produzir sólidos de fibra separados, na qual as enzimas celulase e a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase se ligam aos sólidos de fibra separados;

(iii) ressuspensão dos sólidos de fibra separados em uma solução aquosa para produzir uma pasta fluida ressuspensa; e

(iv) continuação da hidrólise da pasta fluida ressuspensa para produzir o produto de hidrólise compreendendo glicose.

18. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 17, no qual o agente de ligação é um módulo de ligação de carboidrato operavelmente ligado a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase.

19. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 18, no qual o módulo de ligação de carboidrato é um domínio de ligação de celulose.

5 20. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 17, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), as enzimas celulase são produzidas por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas.

21. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 20, no qual as enzimas celulase são produzidas por *Trichoderma*.

10 22. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 17, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase é produzida por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas.

15 23. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 22, no qual a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase é produzida por *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

24. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 19, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), o domínio de ligação de celulose é um domínio de ligação de celulose de Família I.

20 25. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 19, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), o domínio de ligação de celulose é um domínio de ligação de celulose bacteriana ou fúngica.

25 26. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 19, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase compreende um ligante que liga operavelmente o domínio de ligação de celulose à enzima β -glicosidase.

30 27. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 17, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase está ocorrendo naturalmente.

28. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 19, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), a uma ou mais

do que uma enzima β -glicosidase é uma proteína de fusão geneticamente modificada.

29. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 19, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), cerca de 75% a 5 cerca de 100% (p/p) da enzima β -glicosidase total presentes na composição de enzima compreendem um domínio de ligação de celulose.

30. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 29, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), cerca de 90% a 10 cerca de 100% (p/p) da enzima β -glicosidase total presentes na composição de enzima compreendem um domínio de ligação de celulose.

31. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 17, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), as enzimas celu- 15 lase compreendem uma enzima celobio-hidrolase selecionada a partir do grupo consistindo em enzimas celulase CBHI e CBHII, e combinações destas, e uma enzima endoglucanase selecionada a partir do grupo consistindo em enzimas celulase EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV, e combinações destas.

32. Uso da composição de enzima, de acordo com a reivindicação 17, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), cerca de 75% a 20 cerca de 100% (p/p) das enzimas celulase totais presentes na composição de enzima se ligam aos sólidos de fibra presentes na pasta fluida aquosa.

33. Processo para a hidrólise enzimática de celulose com uma 25 composição de enzima compreendendo enzimas celulase, uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase e um agente de ligação para ligação da enzima β -glicosidase ao estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado, para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose de um esto- que de alimentação lignocelulósico pré-tratado, o processo compreendendo:

(i) hidrolisação parcial de uma pasta fluida aquosa do estoque de 30 alimentação lignocelulósico pré-tratado com a composição de enzima para produzir uma pasta fluida hidrosilada compreendendo glicose, oligômeros de glicose, ou uma combinação destes, e sólidos de fibra não-hidrosilados compreendendo celulose e lignina;

(ii) separação dos sólidos de fibra não-hidrosilados a partir da

pasta fluida hidrosilada para produzir sólidos de fibra separados, nos quais as enzimas celulase e a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase se ligam aos sólidos de fibra separados;

5 (iii) ressuspensão dos sólidos de fibra separados em uma solução aquosa para produzir uma pasta fluida ressuspensa; e

(iv) continuação da hidrólise da pasta fluida ressuspensa para produzir o produto de hidrólise compreendendo glicose.

10 34. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual o agente de ligação é um módulo de ligação de carboidrato operavelmente ligado a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase.

35. Processo, de acordo com a reivindicação 34, no qual o módulo de ligação de carboidrato é um domínio de ligação de celulose.

15 36. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), a pasta fluida aquosa tem um teor de sólidos de fibra suspensos ou não-dissolvidos de cerca de 3% a cerca de 30% (p/p).

37. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual os sólidos de fibra não-hidrosilados são separados por microfiltração, centrifugação, filtração a vácuo, ou filtração por pressão.

20 38. Processo, de acordo com a reivindicação 37, no qual os sólidos não-hidrosilados são separados por microfiltração.

39. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual a pasta fluida aquosa é concentrada antes da etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)).

25 40. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual o processo é efetuado em um sistema de hidrólise compreendendo um ou mais do que um reator de hidrólise selecionado a partir do grupo consistindo em um tanque agitado, um tanque não-misturado, uma torre agitada, e uma torre não-misturada.

30 41. Processo, de acordo com a reivindicação 40, no qual a torre agitada é uma torre de fluxo ascendente.

42. Processo, de acordo com a reivindicação 40, no qual a torre

não-misturada é uma torre de fluxo ascendente.

43. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual o processo é um processo em batelada.

5 44. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual o processo é um processo contínuo.

45. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual, cerca de 70% a cerca de 100% de celulose da pasta fluida aquosa são convertidos em glicose.

10 46. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual uma corrente compreendendo glicose produzida na etapa (i) é combinada com uma corrente compreendendo glicose produzida na etapa (iv), para produzir uma corrente de açúcar combinada.

15 47. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), o estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado é obtido de palha de trigo, palha de aveia, palha de cevada, palha de milho, palha de forragem, palha de feijão-soja, palha de canola, palha de arroz, cana de açúcar, bagaço, palha de vara, grama de capim de corda, grama de corda, ou miscanthus.

20 48. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), as enzimas celulase são adicionadas a uma dosagem de cerca de 1,0 a cerca de 40,0 IU por grama de celulose.

25 49. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), a uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase é adicionada a uma dosagem de 35 a cerca de 200 IU por grama de celulose.

50. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), as enzimas celulase são produzidas por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma combinação destas.

30 51. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), a enzima β -glicosidase é produzida por *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Thermobifida*, ou uma

combinação destas.

52. Processo, de acordo com a reivindicação 51, no qual a enzima β -glicosidase é produzida por *Aspergillus* ou *Trichoderma*.

53. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual a etapa de continuação da hidrólise (etapa (iv)) é efetuada por cerca de 12 a cerca de 200 horas.

54. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual a etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)) é efetuada por cerca de 12 a cerca de cerca de 24 horas.

55. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (i)), cerca de 75% a cerca de 100% (p/p) das enzimas celulase totais presentes se ligam aos sólidos de fibra presentes na pasta fluida aquosa.

56. Processo, de acordo com a reivindicação 33, no qual, na etapa de hidrolisação parcial (etapa (iii)), a solução aquosa é uma água de processo.

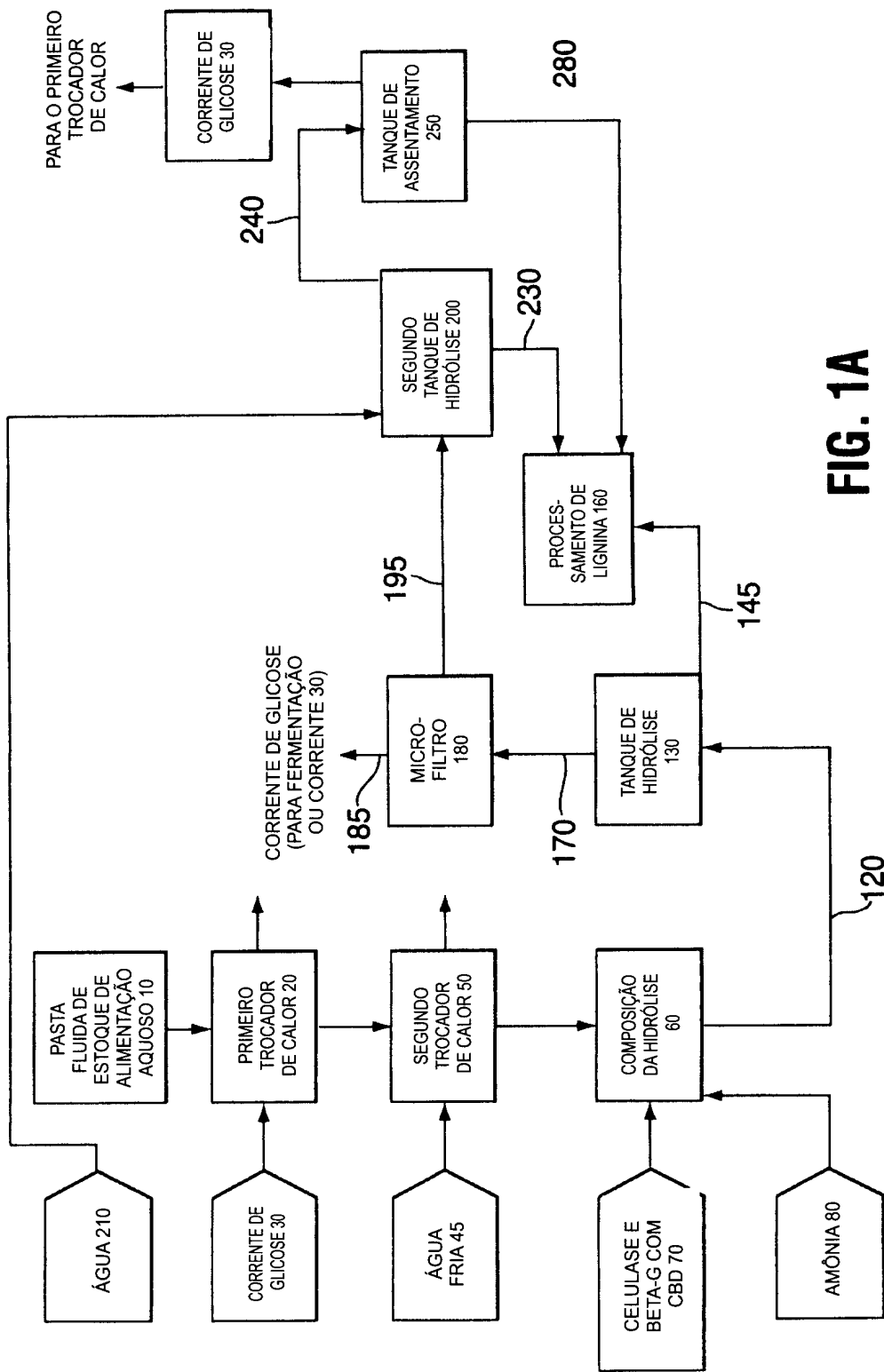


FIG. 1A

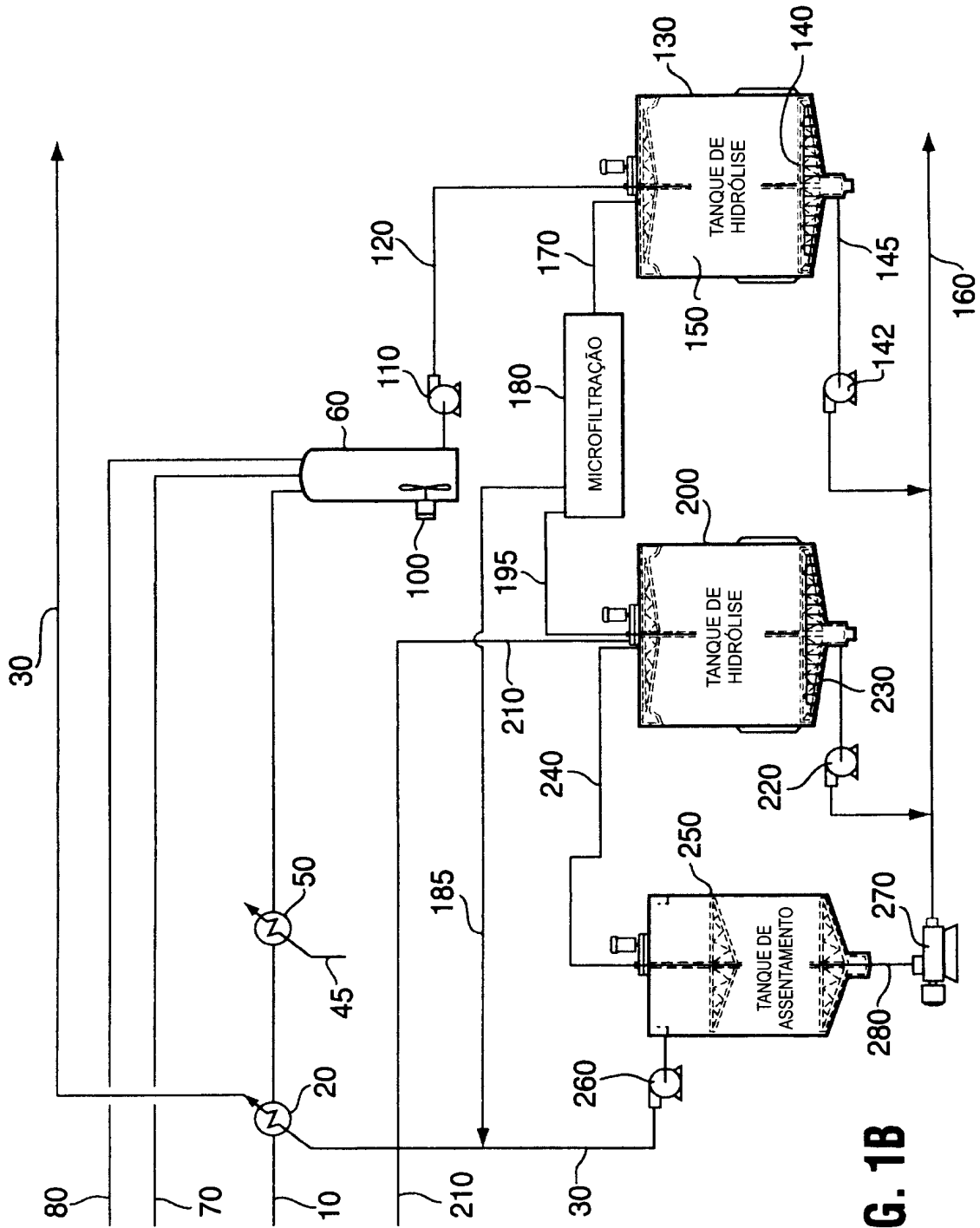


FIG. 1B

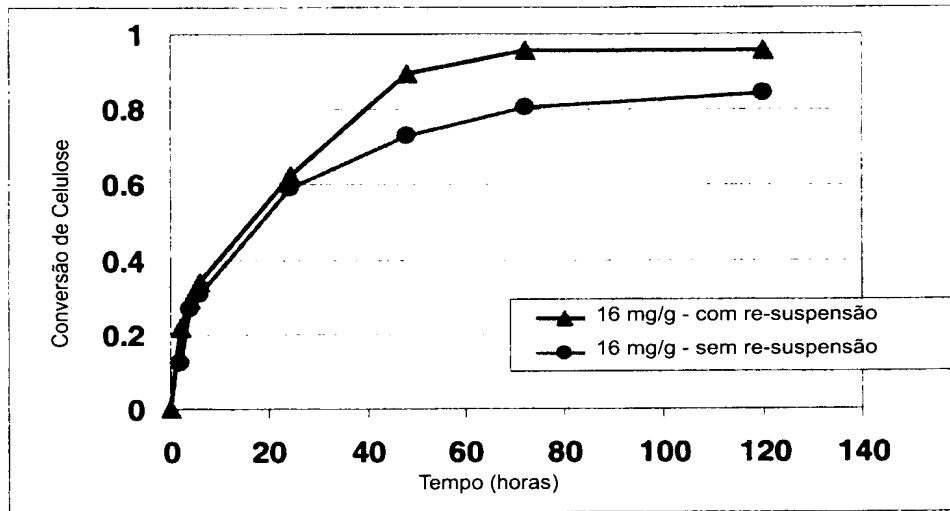


FIG. 2A

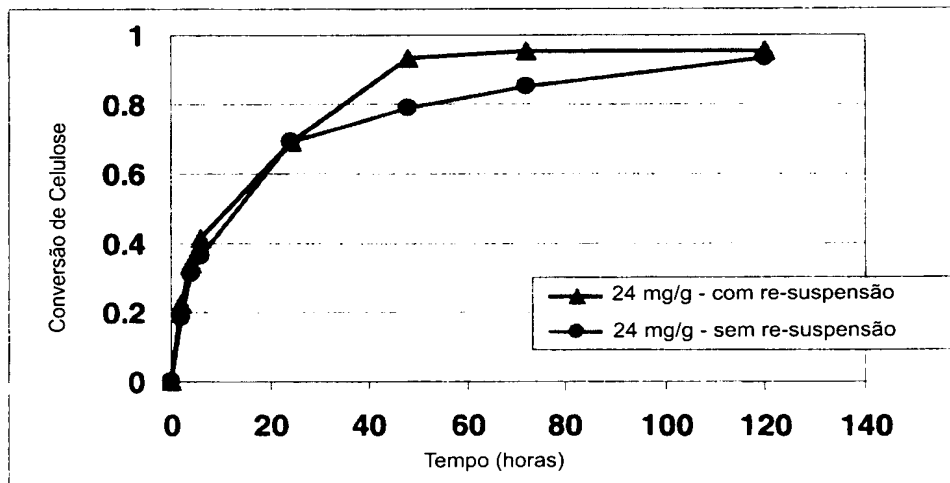


FIG. 2B

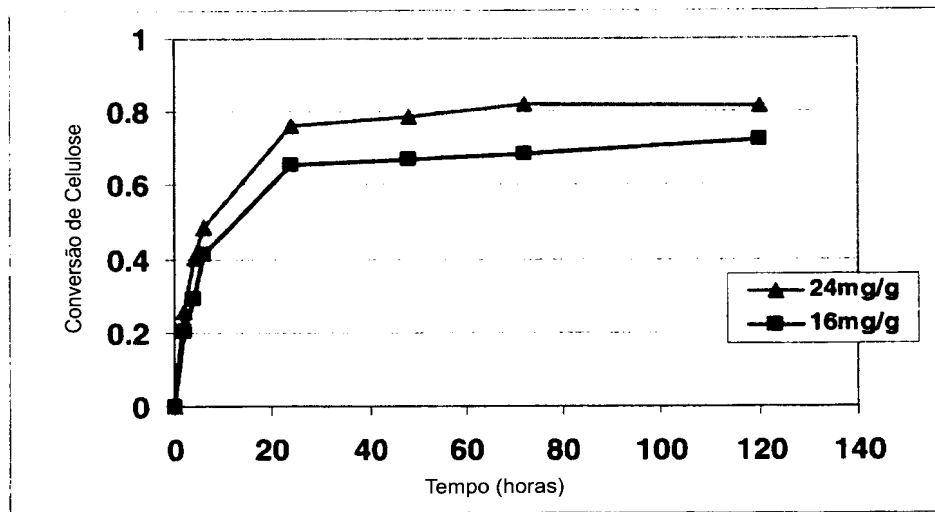


FIG. 3

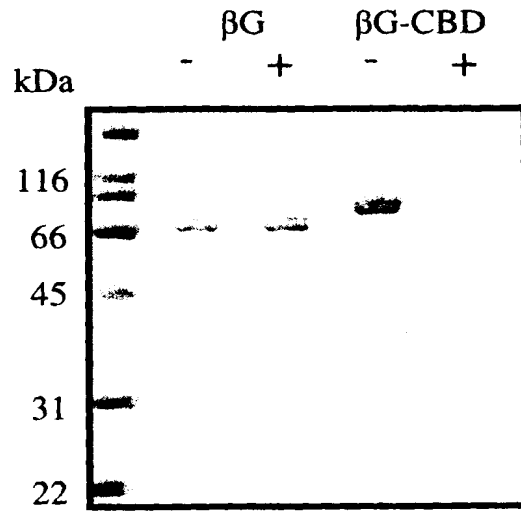


Figure 4A

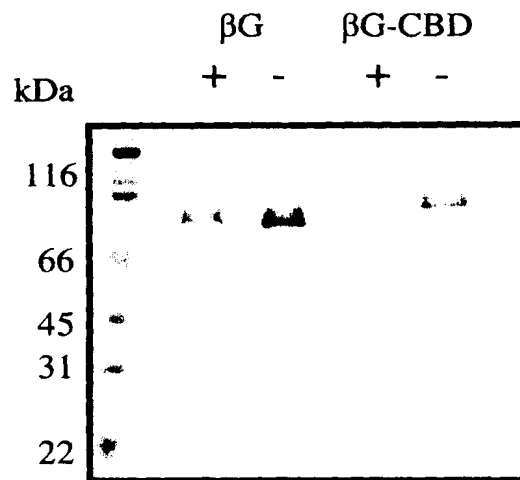


Figure 4B

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES DE ENZIMA E MÉTODOS PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA APERFEIÇOADA DE CELULOSE**".

A presente invenção refere-s a um processo para a hidrólise enzimática de celulose para produzir um produto de hidrólise compreendendo glicose a partir de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado e enzimas para uso no processo. O processo compreende hidrolisação parcial de uma pasta fluida aquosa de um estoque de alimentação lignocelulósico pré-tratado com enzimas celulase, uma ou mais do que uma enzima β -glicosidase e um agente de ligação para ligação da β -glicosidase aos sólidos de fibra presentes na pasta fluida aquosa. Os sólidos de fibra separados são, desse modo, obtidos, e, em seguida, ressuspensos em uma solução aquosa para produzir uma pasta fluida ressuspensa. A hidrólise é, em seguida, continuada para produzir o produto de hidrólise compreendendo glicose.