



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020003866-0 A2



(22) Data do Depósito: 28/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 08/09/2020

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO, E, COMPOSIÇÃO.

(51) Int. Cl.: C12P 7/06; C12P 19/02; C12P 19/14.

(30) Prioridade Unionista: 30/08/2017 US 62/551827.

(71) Depositante(es): NOVOZYMES A/S.

(72) Inventor(es): CHEE-LEONG SOONG.

(86) Pedido PCT: PCT US2018048238 de 28/08/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/046232 de 07/03/2019

(85) Data da Fase Nacional: 27/02/2020

(57) Resumo: A presente invenção se relaciona com processos melhorados para produção de etanol a partir de materiais contendo amido pelo uso combinado de pelo menos uma endo-protease e pelo menos uma exo-protease em um processo SSF, e em que a endo-protease é selecionada de uma endo-protease da família M35 e a exo-protease são selecionadas de uma exo-protease da família S53. Mais particularmente, a exo-protease deve constituir pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases.

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO, E, COMPOSIÇÃO

Referência à listagem de sequências

[001] Este pedido contém uma Listagem de Sequências em forma legível por computador. A forma legível por computador é incorporada aqui por referência.

ÁREA DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção se relaciona com processos para produção de produtos de fermentação a partir de material contendo amido gelatinizado e/ou não gelatinizado.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] A produção de produtos de fermentação, tais como etanol, a partir de material contendo amido é bem conhecida na técnica. Geralmente são usados dois tipos diferentes de processos. O processo o mais comumente usado, frequentemente referido como um “processo convencional”, inclui liquefação de amido gelatinizado a elevada temperatura usando tipicamente uma alfa-amilase bacteriana, seguida por sacarificação e fermentação simultâneas levadas a cabo na presença de uma glucoamilase e um organismo fermentador. Processos de conversão de amido convencionais, tais como processos de liquefação e sacarificação, são descritos na, p.ex., Patente dos E.U.A. No. 3,912,590, EP252730 e EP063909.

[004] Outro processo bem conhecido, frequentemente referido como um processo de “hidrólise de amido em bruto” (processo RSH) inclui sacarificação e fermentação simultâneas de amido granular abaixo da temperatura de gelatinização inicial tipicamente na presença de uma alfa-amilase fúngica ácida e uma glucoamilase.

[005] A Patente dos EUA No. 5,231,017-A divulga o uso de uma protease fúngica ácida durante a fermentação de etanol em um processo compreendendo liquefação de amido gelatinizado com uma alfa-amilase.

[006] WO 2003/066826 divulga um processo de hidrólise de amido em bruto (processo RSH) levado a cabo em purê não cozido na presença de glucoamilase fúngica, alfa-amilase e protease fúngica.

[007] WO 2007/145912 divulga um processo para produção de etanol compreendendo contato de uma pasta semifluida compreendendo amido granular obtida a partir de material vegetal com uma alfa-amilase capaz de solubilizar o amido granular a um pH de 3,5 a 7,0 e a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização do amido durante um período de 5 minutos a 24 horas; obtenção de um substrato compreendendo mais do que 20% de glucose e fermentação do substrato na presença de um organismo fermentador e enzimas hidrolisantes do amido a uma temperatura entre 10 °C e 40 °C durante um período de 10 horas a 250 horas. Enzimas adicionais adicionadas durante o passo de contato podem incluir protease.

[008] WO 2010/008841 divulga processos para produção de produtos de fermentação, tais como etanol, a partir de material contendo amido gelatinizado bem como não gelatinizado por sacarificação do material de amido usando pelo menos uma glucoamilase e uma metaloprotease e fermentação usando um organismo de levedura. Particularmente, a metaloprotease é derivada de uma estirpe de *Thermoascus aurantiacus*.

[009] WO 2014/037438 divulga serina proteases derivadas de *Meripilus giganteus*, *Trametes versicolor* e *Dichomitus squalens* e seu uso em ração animal.

[0010] WO 2015/078372 divulga serina proteases derivadas de *Meripilus giganteus*, *Trametes versicolor* e *Dichomitus squalens* para uso em um processo de moagem a úmido do amido.

[0011] WO 2003/048353 divulga uma metaloprotease de *Thermoascus aurantiacus*.

[0012] WO 2013/102674 divulga exo-proteases pertencendo à família S53.

[0013] Proteases S53 são conhecidas na técnica, p.ex., um peptídeo S53 de *Grifola frondosa* com o número de acesso MER078639. Uma protease S53 de *Postia placenta* (Uniprot: B8PMI5) foi isolada por Martinez *et al.* em “*Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus Postia placenta supports unique mechanisms of lignocellulose conversion*”, 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 1954-1959.

[0014] Vanden Wymelenberg *et al.* isolaram uma protease S53 (Uniprot: Q281W2) em “*Computational analysis of the Phanerochaete chrysosporium v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins*”, 2006, *Fungal Genet. Biol.* 43: 343-356. Outro polipeptídeo S53 de *Postia placenta* (Uniprot:B8P431) foi identificado por Martinez *et al.* em “*Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus Postia placenta supports unique mechanisms of lignocellulose conversion*”, 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 1954-1959.

[0015] Floudas *et al.* publicaram a sequência de uma protease S53 em “*The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes*”, 2012, *Science*, 336: 1715-1719. Fernandez-Fueyo *et al.* publicaram as sequências de três serina proteases em “*Comparative genomics of Ceriporiopsis subvermispora and Phanerochaete chrysosporium provide insight into selective ligninolysis*”, 2012, *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 5458-5463 (Uniprot: M2QQ01, Uniprot: M2QWH2, Uniprot: M2RD67).

[0016] É um objetivo da presente invenção identificar misturas de proteases que resultarão em um rendimento de etanol aumentado em um processo de amido até etanol, quando as referidas proteases são adicionadas/estão presentes durante a sacarificação e/ou fermentação.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0017] Os inventores da presente invenção descobriram surpreendentemente que a adição de uma mistura de endo-protease e exo-protease ao pro-

cesso SSF resultará em um rendimento de etanol aumentado. A invenção proporciona em um primeiro aspecto um processo para produção de um produto de fermentação a partir de material contendo amido compreendendo:

a) sacarificação do material contendo amido a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização inicial do referido material contendo amido usando uma enzima geradora de fonte de carboidratos; e

b) fermentação usando um organismo fermentador; em que os passos a) e/ou b) são realizados na presença de uma mistura de endo-protease e exo-protease, em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total, e em que a endo-protease é selecionada de uma endo-protease da família M35 e a exo-protease é selecionada de uma exo-protease da família S53.

[0018] Em um segundo aspecto, a invenção proporciona um processo para produção de um produto de fermentação a partir de material contendo amido compreendendo os passos de:

(a) liquefação do material contendo amido a uma temperatura acima da temperatura de gelatinização inicial do referido material contendo amido na presença de uma alfa-amilase;

(b) sacarificação do material liquefeito obtido no passo (a) usando uma enzima geradora de fonte de carboidratos;

(c) fermentação usando um organismo fermentador; em que os passos b) e/ou c) são realizados na presença de uma mistura de endo-protease e exo-protease, em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total, e em que a endo-protease é selecionada de uma endo-protease da família M35 e a exo-protease é selecionada de uma exo-protease da família S53.

[0019] Em um terceiro aspecto, a invenção se relaciona com uma

composição compreendendo uma mistura de endo-protease e exo-protease, em que a endo-protease é selecionada de uma endo-protease da família M35 e a exo-protease é selecionada de uma exo-protease da família S53.

DEFINIÇÕES

[0020] **Proteases:** O termo “protease” inclui qualquer enzima pertencendo ao grupo de enzimas EC 3.4 (incluindo cada uma das suas dezoito subclasses). O número EC se refere à *Enzyme Nomenclature 1992* de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, Califórnia, incluindo suplementos 1-5 publicada em 1994, *Eur. J. Biochem.* 223: 1-5; 1995, *Eur. J. Biochem.* 232: 1-6; 1996, *Eur. J. Biochem.* 237: 1-5; 1997, *Eur. J. Biochem.* 250: 1-6; e 1999, *Eur. J. Biochem.* 264: 610-650, respectivamente. A nomenclatura é regularmente suplementada e atualizada; ver, p.ex., a World Wide Web (WWW) em <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

[0021] As proteases são classificadas com base no seu mecanismo catalítico nos seguintes grupos: Serina proteases (S), Cisteína proteases (C), Proteases aspárticas (A), Metaloproteases (M) e Proteases desconhecidas, ou ainda não classificadas, (U) ver *Handbook of Proteolytic Enzymes*, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner (eds), Academic Press (1998), em particular a parte da introdução geral.

[0022] Os polipeptídeos tendo atividade de protease, ou proteases, são por vezes também designados peptidases, proteinases, peptídeo hidrolases ou enzimas proteolíticas. As proteases podem ser do tipo exo (exopeptidases) que hidrolisam peptídeos começando em qualquer uma das suas extremidades, ou do tipo endo que atuam internamente em cadeias de polipeptídeos (endopeptidases).

[0023] Em modalidades particulares, as proteases para uso nos processos da invenção são selecionadas do grupo consistindo em:

- (a) proteases pertencendo às metaloendopeptidases EC 3.4.24;
- (b) metaloproteases pertencendo ao grupo M do *Handbook*

acima;

(c) metaloproteases ainda não atribuídas a clãs (designação: Clã MX) ou pertencendo a qualquer um dos clãs MA, MB, MC, MD, ME, MF, MG, MH (como definido nas pp. 989-991 do *Handbook* acima);

(d) outras famílias de metaloproteases (como definido nas pp. 1448-1452 do *Handbook* acima);

(e) metaloproteases com um motivo HEXXH;

(f) metaloproteases com um motivo HEFTH;

(g) metaloproteases pertencendo a qualquer uma das famílias M3, M26, M27, M32, M34, M35, M36, M41, M43 ou M47 (como definido nas pp. 1448-1452 do *Handbook* acima); e

(h) metaloproteases pertencendo à família M35 (como definido nas pp. 1492-1495 do *Handbook* acima).

[0024] **Protease S53:** O termo “S53” significa uma atividade de protease selecionada de:

(a) proteases pertencendo ao grupo de enzimas EC 3.4.21;
e/ou

(b) proteases pertencendo ao grupo de enzimas EC 3.4.14;
e/ou

(c) Serina proteases da família de peptidases S53 que compreende dois tipos diferentes de peptidases: tripeptidil aminopeptidases (tipo exo) e endopeptidases; como descrito em 1993, *Biochem. J.* 290: 205-218 e na base de dados de proteases MEROPS, lançamento, 9.4 (31 janeiro 2011) (www.merops.ac.uk). A base de dados é descrita em Rawlings, N. D., Barrett, A. J. e Bateman, A., 2010, “*MEROPS: the peptidase database*”, *Nucl. Acids Res.* 38: D227-D233.

[0025] Para se determinar se uma dada protease é uma Serina protease, e uma protease da família S53, é feita referência ao *Handbook* acima e aos princípios indicados nele. Tal determinação pode ser levada a cabo para

todos os tipos de proteases, sejam proteases ocorrendo naturalmente ou de tipo selvagem; ou proteases geneticamente manipuladas ou sintéticas.

[0026] As peptidases da família S53 tendem a ser o mais ativas a pH ácido (ao contrário das subtilisinas homólogas), e isto pode ser atribuído à importância funcional de resíduos carboxílicos, notavelmente Asp, no espaço de oxianion. As sequências de aminoácidos não são intimamente similares às daquelas da família S8 (*i.e.*, subtilisinas serina endopeptidases e homólogos), e isto, tomada em conjunto com os resíduos de locais ativos bastante diferentes e o pH mais baixo resultante para atividade máxima, proporciona uma diferença substancial em relação a essa família. O dobramento de proteínas da unidade de peptidase para membros desta família se assemelha àquele da subtilisina, tendo o tipo de clã SB.

[0027] **Protease S8:** A maioria dos membros desta família são endopeptidases e são ativos a pH neutro-levemente alcalino. Muitas peptidases na família são termoestáveis. A caseína é frequentemente usada como um substrato de proteína e um substrato sintético típico é Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NHPhNO₂. A maioria dos membros da família são peptidases não específicas com uma preferência para clivarem resíduos hidrofóbicos. Ligação à definição de família S10 para atividade e especificidades: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=S8>

[0028] **Protease S10:** As carboxipeptidases na família S10 mostram dois tipos principais de especificidade. Algumas (p.ex., carboxipeptidase C) mostram preferência para resíduos hidrofóbicos nas posições P1 e P1". As carboxipeptidases do segundo conjunto (p.ex., carboxipeptidase D) exibem uma preferência pelos aminoácidos básicos em qualquer lado da ligação cinzível, mas são também capazes de clivar peptídeos com resíduos hidrofóbicos em estas posições. Ligação à definição de família S10 para atividade e especificidades: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=S10>

[0029] **Variante alélica:** O termo “variante alélica” significa qualquer

uma de duas ou mais formas alternativas de um gene ocupando o mesmo locus cromossômico. A variação alélica surge naturalmente através de mutação e pode resultar em polimorfismo dentro de populações. As mutações de genes podem ser silenciosas (nenhuma mudança no polipeptídeo codificado) ou podem codificar polipeptídeos tendo sequências de aminoácidos alteradas. Uma variante alélica de um polipeptídeo é um polipeptídeo codificado por uma variante alélica de um gene.

[0030] **Domínio catalítico:** O termo “domínio catalítico” significa a região de uma enzima contendo a maquinaria catalítica da enzima.

[0031] **cDNA:** O termo “cDNA” significa uma molécula de DNA que pode ser preparada por transcrição reversa de uma molécula de mRNA, processada, madura, obtida a partir de uma célula eucariótica ou procariótica. O cDNA não tem sequências de íntron que possam estar presentes no DNA genômico correspondente. O transcrito de RNA primário, inicial é um precursor de mRNA que é processado através de uma série de passos, incluindo processamento, antes de aparecer como mRNA processado maduro.

[0032] **Sequência codificante:** O termo “sequência codificante” significa um polinucleotídeo que especifica diretamente a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo. As fronteiras da sequência codificante são geralmente determinadas por uma grelha de leitura aberta, que começa com um códon de iniciação tal como ATG, GTG, ou TTG e termina com um códon de terminação tal como TAA, TAG ou TGA. A sequência codificante pode ser um DNA genômico, cDNA, DNA sintético ou uma sua combinação.

[0033] **Sequências de controle:** O termo “sequências de controle” significa sequências de ácidos nucleicos necessárias para expressão de um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo maduro da presente invenção. Cada sequência de controle pode ser nativa (*i.e.*, do mesmo gene) ou estranha (*i.e.*, de um gene diferente) ao polinucleotídeo codificando o polipeptídeo ou nativa ou estranha entre si. Tais sequências de controle incluem, mas não es-

ção limitadas a, um líder, sequência de poliadenilação, sequência do pró-peptídeo, promotor, sequência do peptídeo-sinal e terminador da transcrição. Em um mínimo, as sequências de controle incluem um promotor e sinais de paragem transcricional e translacional. As sequências de controle podem ser proporcionadas com ligantes para o propósito de introdução de locais de restrição específicos facilitando ligação das sequências de controle com a região codificante do polinucleotídeo codificando um polipeptídeo.

[0034] **Expressão:** O termo “expressão” inclui qualquer passo envolvido na produção de um polipeptídeo incluindo, mas não se limitando a, transcrição, modificação pós-transcricional, tradução, modificação pós-translacional e secreção.

[0035] **Vetor de expressão:** O termo “vetor de expressão” significa uma molécula de DNA linear ou circular compreendendo um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo e está operacionalmente ligado a sequências de controle que proporcionam sua expressão.

[0036] **Fragmento:** O termo “fragmento” significa um polipeptídeo tendo um ou mais (p.ex., vários) aminoácidos ausentes do terminal amino e/ou carboxila de um polipeptídeo ou domínio maduro; em que o fragmento tem atividade de serina protease.

[0037] **Célula hospedeira:** O termo “célula hospedeira” significa qualquer tipo de célula que seja suscetível a transformação, transfecção, transdução ou similar com um construto de ácido nucleico ou vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção. O termo “célula hospedeira” engloba qualquer descendência de uma célula genitora que não seja idêntica à célula genitora devido a mutações que ocorrem durante a replicação.

[0038] **Isolado:** O termo “isolado” significa uma substância em uma forma ou ambiente que não ocorre na natureza. Exemplos não limitantes de substâncias isoladas incluem (1) qualquer substância não ocorrendo natural-

mente, (2) qualquer substância incluindo, mas não se limitando a, qualquer enzima, variante, ácido nucleico, proteína, peptídeo ou cofator, que é pelo menos parcialmente removida de um ou mais dos ou todos os constituintes ocorrendo naturalmente aos quais está associada na natureza; (3) qualquer substância modificada pelo homem em relação a essa substância encontrada na natureza; ou (4) qualquer substância modificada por aumento da quantidade da substância em relação a outros componentes aos quais está naturalmente associada (por exemplo, produção recombinante em uma célula hospedeira; múltiplas cópias de um gene codificando a substância; e uso de um promotor mais forte do que o promotor naturalmente associado ao gene codificando a substância). Uma substância isolada pode estar presente em uma amostra de caldo de fermentação; p.ex., uma célula hospedeira pode ser geneticamente modificada para expressar o polipeptídeo da invenção. O caldo de fermentação dessa célula hospedeira compreenderá o polipeptídeo isolado.

[0039] **Polipeptídeo maduro:** O termo “polipeptídeo maduro” significa um polipeptídeo em sua forma final após tradução e quaisquer modificações pós-translacionais, tais como processamento N-terminal, truncação C-terminal, glicosilação, fosforilação, etc.

[0040] É conhecido na técnica que uma célula hospedeira pode produzir uma mistura de dois ou mais polipeptídeos maduros diferentes (*i.e.*, com um aminoácido C-terminal e/ou N-terminal diferente) expressos pelo mesmo polinucleotídeo. Também é conhecido na técnica que diferentes células hospedeiras processam polipeptídeos diferentemente e, assim, uma célula hospedeira expressando um polinucleotídeo pode produzir um polipeptídeo maduro diferente (p.ex., tendo um aminoácido C-terminal e/ou N-terminal diferente) em comparação com outra célula hospedeira expressando o mesmo polinucleotídeo.

[0041] **Sequência codificante do polipeptídeo maduro:** O termo “sequência codificante do polipeptídeo maduro” significa um polinucleotídeo

que codifica um polipeptídeo maduro tendo atividade de serina protease.

[0042] **Construto de ácido nucleico:** O termo “construto de ácido nucleico” significa uma molécula de ácido nucleico, de fita simples ou dupla, que é isolada de um gene ocorrendo naturalmente ou é modificada para conter segmentos de ácidos nucleicos de uma maneira que não existiria de outro modo na natureza ou que é sintética, que compreende uma ou mais sequências de controle.

[0043] **Operacionalmente ligado:** O termo “operacionalmente ligado” significa uma configuração na qual uma sequência de controle é colocada em uma posição apropriada em relação à sequência codificante de um polinucleotídeo tal que a sequência de controle dirija a expressão da sequência codificante.

[0044] **Atividade de protease:** O termo “atividade de protease” significa atividade proteolítica (EC 3.4). Existem vários tipos de atividade de protease tais como proteases tipo tripsina clivando no lado do terminal carbóxi de resíduos Arg e Lys e proteases tipo quimotripsina clivando no lado do terminal carbóxi de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos.

[0045] A atividade de protease pode ser medida usando qualquer ensaio, no qual um substrato é empregue, que inclua ligações de peptídeo relevantes para a especificidade da protease em questão. O pH do ensaio e a temperatura do ensaio são do mesmo modo para serem adaptados à protease em questão. Exemplos de valores de pH do ensaio são pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12. Exemplos de temperaturas do ensaio são 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 ou 95 °C. Exemplos de substratos de protease gerais são caseína, albumina de soro bovino e hemoglobina. No método clássico de Anson e Mirsky é usada hemoglobina desnaturada como substrato e, após a incubação do ensaio com a protease em questão, a quantidade de hemoglobina solúvel em ácido tricloroacético é determinada como uma medição da atividade de protease (Anson, M.L. e Mirsky, A.E., 1932, J. Gen. Physiol.

16: 59 e Anson, M.L., 1938, *J. Gen. Physiol.* 22: 79).

[0046] Para o propósito da presente invenção, a atividade de protease pode ser determinada usando ensaios que são descritos em “Materiais e Métodos”, tais como o ensaio Cinético de Suc-AAPF-pNA, Ensaio de Protazyme AK, Ensaio cinético de Suc-AAPX-pNA e o-Ftaldialdeído (OPA). Para o ensaio de Protazyme AK, o substrato insolúvel de Protazyme AK (Caseína Reticulada com Azurina) libera uma cor azul quando incubado com a protease e a cor é determinada como uma medida da atividade de protease. Para o ensaio de Suc-AAPF-pNA, o substrato incolor de Suc-AAPF-pNA libera para-nitroanilina amarela quando incubado com a protease e a cor amarela é determinada como uma medida da atividade de protease.

[0047] **Identidade de sequências:** A relação entre duas sequências de aminoácidos ou entre duas sequências de nucleotídeos é descrita pelo parâmetro “identidade de sequências”.

[0048] Para propósitos da presente invenção, a identidade de sequências entre duas sequências de aminoácidos é determinada usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) como implementado no programa Needle do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferencialmente versão 5.0.0 ou posterior. Os parâmetros usados são penalidade de abertura de lacunas de 10, penalidade de extensão de lacunas de 0,5 e a matriz de substituição EBLOSUM62 (versão EMBOSS de BLOSUM62). O resultado de Needle identificado “identidade mais longa” (obtido usando a opção –nobrief) é usado como a porcentagem de identidade e é calculado como se segue:

$$\text{(Resíduos Idênticos x 100)} / (\text{Comprimento do Alinhamento} - \text{Número Total de Lacunas no Alinhamento})$$

[0049] Para propósitos da presente invenção, a identidade de sequências entre duas sequências de desoxirribonucleotídeos é determinada usando o

algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, *supra*) como implementado no programa Needle do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *supra*), preferencialmente versão 5.0.0 ou posterior. Os parâmetros usados são penalidade de abertura de lacunas de 10, penalidade de extensão de lacunas de 0,5 e a matriz de substituição EDNAFULL (versão EMBOSS de NCBI NUC4.4). O resultado de Needle identificado “identidade mais longa” (obtido usando a opção `-nobrief`) é usado como a porcentagem de identidade e é calculado como se segue:

$$\frac{(\text{Desoxirribonucleotídeos Idênticos} \times 100)}{(\text{Comprimento do Alinhamento} - \text{Número Total de Lacunas no Alinhamento})}$$

[0050] **Subsequência:** O termo “subsequência” significa um polinucleotídeo tendo um ou mais (p.ex., vários) nucleotídeos ausentes da extremidade 5' e/ou 3' de uma sequência codificante do polipeptídeo maduro, em que a subsequência codifica um fragmento tendo atividade de protease.

[0051] **Variante:** O termo “variante” significa um polipeptídeo tendo atividade de protease compreendendo uma alteração, *i.e.*, uma substituição, inserção, e/ou deleção, em uma ou mais (p.ex., várias) posições. Uma substituição significa reposicionamento do aminoácido ocupando uma posição com um aminoácido diferente; uma deleção significa remoção do aminoácido ocupando uma posição; e uma inserção significa adição de um aminoácido adjacente ao e imediatamente após o aminoácido ocupando uma posição.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0052] A presente invenção se relaciona com processos melhorados para produção de etanol a partir de materiais contendo amido pelo uso combinado de pelo menos uma endo-protease e pelo menos uma exo-protease em um processo SSF. Mais particularmente, a exo-protease deve constituir pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total.

[0053] Mais especificamente, a presente divulgação se relaciona com um processo para produção de um produto de fermentação a partir de material contendo amido compreendendo:

a) sacarificação do material contendo amido a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização inicial do referido material contendo amido usando uma enzima geradora de fonte de carboidratos; e

b) fermentação usando um organismo fermentador; em que os passos a) e/ou b) são realizados na presença de uma mistura de endo-protease e exo-protease, e em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total.

[0054] Em um segundo aspecto, a divulgação proporciona um processo para produção de um produto de fermentação a partir de material contendo amido compreendendo os passos de:

(a) liquefação do material contendo amido a uma temperatura acima da temperatura de gelatinização inicial do referido material contendo amido na presença de uma alfa-amilase;

(b) sacarificação do material liquefeito obtido no passo (a) usando uma enzima geradora de fonte de carboidratos;

(c) fermentação usando um organismo fermentador; em que os passos b) e/ou c) são realizados na presença de uma mistura de endo-protease e exo-protease, e em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total.

[0055] Processos para a produção de produtos de fermentação, p.ex., etanol, a partir de materiais contendo amido são bem conhecidos na técnica. Geralmente são usados dois tipos diferentes de processos. O processo o mais comumente usado, frequentemente referido como um “processo convencional”, inclui liquefação de amido gelatinizado a elevada temperatura usando

tipicamente uma alfa-amilase bacteriana, seguida por sacarificação e fermentação simultâneas levadas a cabo na presença de uma glucoamilase e um organismo fermentador. Outro processo bem conhecido, frequentemente referido como um processo de “hidrólise de amido em bruto” (processo RSH) inclui sacarificação e fermentação simultâneas de amido granular abaixo da temperatura de gelatinização inicial tipicamente na presença de uma alfa-amilase fúngica ácida e uma glucoamilase.

[0056] O amido nativo consiste em grânulos microscópicos, que são insolúveis em água à temperatura ambiente. Quando a pasta semifluida de amido aquosa é aquecida, os grânulos incham e eventualmente rompem, dispersando as moléculas de amido na solução. A temperaturas até cerca de 50 °C a 75 °C, o inchaço pode ser reversível. No entanto, com temperaturas mais elevadas, começa um inchaço irreversível chamado “gelatinização”. Durante este processo de “gelatinização” existe um aumento dramático na viscosidade. O amido granular a ser processado pode ser uma qualidade de amido altamente refinada, preferencialmente pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 99,5% puro ou pode ser um material contendo amido mais em bruto compreendendo grãos inteiros (p.ex., moídos) incluindo frações diferentes de amido tais como resíduos germinativos e fibras. A matéria-prima, tal como grãos inteiros, pode ser reduzida no tamanho das partículas, p.ex., por moagem, de modo a abrir a estrutura e permitir processamento adicional. Na moagem a seco, os grãos inteiros são moídos e usados. A moagem a úmido dá uma boa separação de germen e farinha (grânulos de amido e proteína) e é frequentemente aplicada em localizações onde o hidrolisado de amido é usado na produção de, p.ex., xaropes. A moagem tanto a seco como a úmido é bem conhecida na técnica de processamento do amido e pode ser usada em um processo da invenção. Métodos para redução do tamanho das partículas do material contendo amido são conhecidos dos peritos na técnica.

[0057] Como o nível de sólidos é 30-40% em um processo industrial

típico, o amido tem de ser diluído ou “liquefeito” tal que possa ser adequadamente processado. Esta redução na viscosidade é principalmente alcançada por degradação enzimática na prática comercial corrente.

[0058] A liquefação é levada a cabo na presença de uma alfa-amilase, preferencialmente uma alfa-amilase bacteriana e/ou alfa-amilase fúngica ácida. Em uma modalidade, uma fitase está também presente durante a liquefação. Em uma modalidade, enzimas reductoras da viscosidade tais como uma xilanase e/ou beta-glucanase estão também presentes durante a liquefação.

[0059] Durante a liquefação, o amido de cadeia longa é degradado em unidades mais curtas ramificadas e lineares (maltodextrinas) por uma alfa-amilase. A liquefação pode ser levada a cabo como um processo de pasta semifluida a quente em três passos. A pasta semifluida é aquecida até entre 60-95 °C (p.ex., 70-90 °C, tal como 77-86 °C, 80-85 °C, 83-85 °C) e uma alfa-amilase é adicionada para iniciar a liquefação (diluição).

[0060] A pasta semifluida pode em uma modalidade ser cozida com jato a entre 95-140 °C, p.ex., 105-125 °C, durante cerca de 1-15 minutos, p.ex., cerca de 3-10 minutos, especialmente em torno de 5 minutos. A pasta semifluida é depois resfriada até 60-95 °C e mais alfa-amilase é adicionada para se obter a hidrólise final (liquefação secundária). O processo de cozimento com jato é levado a cabo a pH 4,5-6,5, tipicamente a um pH entre 5 e 6. A alfa-amilase pode ser adicionada como uma dose única, p.ex., antes do cozimento com jato.

[0061] O processo de liquefação é levado a cabo a entre 70-95 °C, tal como 80-90 °C, tal como em torno de 85 °C, durante cerca de 10 minutos a 5 horas, tipicamente durante 1-2 horas. O pH é entre 4 e 7, tal como entre 4,5 e 5,5. De modo a assegurar estabilidade de enzimas ótima sob estas condições, cálcio pode ser opcionalmente adicionado (para proporcionar 1-60 ppm de íons de cálcio livres, tal como cerca de 40 ppm de íons de cálcio livres). Após tal tratamento, o amido liquefeito terá tipicamente um “equivalente de dextro-

se” (DE) de 10-15.

[0062] Geralmente, a liquefação e as condições de liquefação são bem conhecidas na técnica.

[0063] As alfa-amilases para uso em liquefação são preferencialmente alfa-amilases estáveis ácidas bacterianas. Particularmente, a alfa-amilase é de uma *Exiguobacterium* sp. ou uma *Bacillus* sp. tal como, p.ex., *Bacillus stea-thermophilus* ou *Bacillus licheniformis*.

[0064] A sacarificação pode ser levada a cabo usando condições bem conhecidas na técnica com uma enzima geradora de fonte de carboidratos, em particular uma glucoamilase, ou uma beta-amilase e opcionalmente uma enzima desramificadora, tal como uma isoamilase ou uma pululanase. Por exemplo, o passo de sacarificação total pode durar de cerca de 24 a cerca de 72 horas. No entanto é comum fazer uma pré-sacarificação de tipicamente 40-90 minutos a uma temperatura entre 30-65 °C, tipicamente cerca de 60 °C, seguida por sacarificação completa durante a fermentação em um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). A sacarificação é tipicamente levada a cabo a uma temperatura na gama de 20-75 °C, p.ex., 25-65 °C e 40-70 °C, tipicamente em torno de 60 °C, e a um pH entre cerca de 4 e 5, normalmente a cerca de pH 4,5.

[0065] Os passos de sacarificação e fermentação podem ser levados a cabo sequencialmente ou simultaneamente. Em uma modalidade, a sacarificação e a fermentação são realizadas simultaneamente (referidas como “SSF”). No entanto é comum realizar um passo de pré-sacarificação durante cerca de 30 minutos a 2 horas (p.ex., 30 a 90 minutos) a uma temperatura de 30 a 65 °C, tipicamente em torno de 60 °C que é seguido por uma sacarificação completa durante a fermentação referido como sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). O pH é usualmente entre 4,2-4,8, p.ex., pH 4,5. Em um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), não existe etapa de retenção para a sacarificação; ao invés, a levedura e as enzimas são adicio-

nadas em conjunto e o processo é depois levado a cabo a uma temperatura de 25-40 °C, tal como entre 28 °C e 35 °C, tal como entre 30 °C e 34 °C, tal como em torno de 32 °C. O processo SSF pode ser levado a cabo a um pH de cerca de 3 e 7, preferencialmente de pH 4,0 a 6,5 ou, mais preferencialmente, de pH 4,5 a 5,5.

[0066] Em uma modalidade, a fermentação dura durante 6 a 120 horas, em particular 24 a 96 horas.

[0067] Ao invés do processo convencional descrito acima, o produto de fermentação, p.ex., etanol, pode ser produzido a partir de material contendo amido sem gelatinização (i.e., sem cozimento) do material contendo amido (frequentemente referido como um processo de “hidrólise de amido em bruto”). O produto de fermentação, tal como etanol, pode ser produzido sem liquefazer a pasta semifluida aquosa contendo o material contendo amido e água. Em uma modalidade, o processo inclui sacarificação do material contendo amido (p.ex., moído), p.ex., amido granular, abaixo da temperatura de gelatinização inicial, preferencialmente na presença de alfa-amilase e/ou enzima(s) geradora(s) de fonte de carboidratos para produzir açúcares que podem ser fermentados no produto de fermentação por um organismo fermentador adequado. Em esta modalidade, o produto de fermentação desejado, p.ex., etanol, é produzido a partir de grãos de cereais não gelatinizados (i.e., não cozidos), preferencialmente moídos, tais como milho.

[0068] Conformemente, em este aspecto, a invenção se relaciona com processos para produção de um produto de fermentação a partir de material contendo amido compreendendo os passos de:

a) sacarificação do material contendo amido a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização inicial do referido material contendo amido usando uma enzima geradora de fonte de carboidratos; e

b) fermentação usando um organismo fermentador; em que

os passos a) e/ou b) são realizados na presença de uma mistu-

ra de endo-protease e exo-protease, e em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases.

[0069] Em uma modalidade particular, os passos a) e b) são realizadas simultaneamente, em que as enzimas sacarificantes e os organismos fermentadores (p.ex., levedura) são adicionados em conjunto e depois levados a cabo a uma temperatura de 25-40 °C. O processo SSF pode ser levado a cabo a um pH de cerca de 3 e 7, preferencialmente de pH 4,0 a 6,5 ou, mais preferencialmente, de pH 4,5 a 5,5. Em uma modalidade, a fermentação dura durante 6 a 120 horas, em particular 24 a 96 horas.

[0070] O termo “temperatura de gelatinização inicial” significa a temperatura mais baixa à qual a gelatinização do amido começa. Em geral, o amido aquecido em água começa a gelatinizar entre cerca de 50 °C e 75 °C; a temperatura exata da gelatinização depende do amido específico e pode ser prontamente determinada pelo especialista. Assim, a temperatura de gelatinização inicial pode variar de acordo com a espécie de planta, com a variedade particular da espécie de planta bem como com as condições de crescimento. No contexto da presente invenção, a temperatura de gelatinização inicial de um dado material contendo amido pode ser determinada como a temperatura na qual a birrefringência é perdida em 5% dos grânulos de amido usando o método descrito por Gorinstein e Lii, 1992, *Starch/Stärke* 44 (12): 461-466. Em uma modalidade, uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização inicial significa que a temperatura reside tipicamente na gama entre 30-75 °C, preferencialmente entre 45-60 °C. Em uma modalidade preferencial, o processo é levado a cabo a uma temperatura de 25 °C a 40 °C, tal como de 28 °C a 35 °C, tal como de 30 °C a 34 °C, preferencialmente em torno de 32 °C.

[0071] Como divulgado acima na seção da técnica antecedente, o uso de proteases durante a fermentação é conhecido na técnica, no entanto, de acordo com a presente invenção, um rendimento de etanol aumentado pode ser obtido quando a sacarificação e/ou a fermentação são realizadas na pre-

sença de uma mistura de endo-protease e exo-protease. Em particular, os presentes inventores descobriram que a exo-protease deve constituir pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total.

[0072] Em uma modalidade, a exo-protease constitui pelo menos 10% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total, tal como pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, particularmente pelo menos 75%, mais particularmente a exo-protease constitui de entre 5 e 95% (p/p) em uma base de proteína de enzima protease total, particularmente 10 e 80% (p/p), particularmente 15 e 70% (p/p), mais particularmente 20 e 60% (p/p) e, ainda mais particularmente, 25 e 50% (p/p) da mistura de proteases na composição em uma base de proteína de enzima protease total.

[0073] Em outra modalidade, a endo-protease e a exo-protease estão presentes em uma razão de 5:2 microgramas de proteína de enzima (EP)/g de sólidos secos (DS), particularmente 5:3, mais particularmente 5:4. As proteases usadas em um processo da invenção são selecionadas de endo-peptidases (endo-proteases) e exo-peptidases (exo-proteases). Entre as endo-peptidases, as serina proteases (EC 3.4.21) e as metaloproteases (EC 3.4.24) são especialmente relevantes.

[0074] A endo-protease pode ser selecionada do grupo consistindo em serina proteases pertencendo à família S53, S8, ou de metaloproteases pertencendo à família M35.

[0075] Em outra modalidade particular, a endo-protease é selecionada de metaloproteases (ver *Handbook of Proteolytic Enzymes*, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner (eds), Academic Press (1998)); em particular, as proteases da invenção são selecionadas do grupo consistindo em:

- (a) proteases pertencendo às metaloendopeptidases EC 3.4.24;
- (b) metaloproteases pertencendo ao grupo M do *Handbook*

acima;

(c) metaloproteases pertencendo à família M35 (como definido nas pp. 1492-1495 do *Handbook* acima).

[0076] Em uma modalidade particular, a endo-protease é selecionada da família M35, mais particularmente protease M35 derivada de *Thermoascus aurantiacus*, o polipeptídeo maduro da qual compreende os aminoácidos 1-177 de SEQ ID NO: 1 ou um polipeptídeo tendo pelo menos 75% de identidade, preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 91%, mais preferencialmente pelo menos 92%, ainda mais preferencialmente pelo menos 93%, o mais preferencialmente pelo menos 94% e, ainda o mais preferencialmente, pelo menos 95%, tal como mesmo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 1.

[0077] A exo-protease é preferencialmente selecionada de uma protease pertencendo à família S10, S53, M14, M28.

[0078] A exo-protease é em outra modalidade selecionada de exo-protease S53 é derivada de uma estirpe de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Thermoascus*, or *Thermomyces*, particularly *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Thermoascus thermophilus* ou *Thermomyces lanuginosus*.

[0079] Em uma modalidade particular, a exo-protease S53 é um polipeptídeo tendo atividade de serina protease, selecionado de um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2 ou o

polipeptídeo de SEQ ID NO: 3.

[0080] Em uma modalidade particular, a exo-protease S53 é um polipeptídeo tendo atividade de serina protease, selecionado de um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 4.

[0081] Antes do início do processo pode ser preparada uma pasta semifluida de material contendo amido, tal como amido granular, tendo 10-55% p/p de sólidos secos (DS), preferencialmente 25-45% p/p de sólidos secos, mais preferencialmente 30-40% p/p de sólidos secos de material contendo amido. A pasta semifluida pode incluir água e/ou águas do processo, tais como vinhaça (contracorrente), água do purificador, condensado ou destilado do evaporador, água do separador lateral da destilação ou água de processo de outras instalações de produtos de fermentação.

[0082] Em uma modalidade particular, o processo da invenção compreende adicionalmente, antes da conversão de um material contendo amido em açúcares/dextrinas, os passos de:

(x) redução do tamanho das partículas do material contendo amido; e

(y) formação de uma pasta semifluida compreendendo o material contendo amido e água.

[0083] Em uma modalidade, o material contendo amido é moído para reduzir o tamanho das partículas. Em uma modalidade, o tamanho das partículas é reduzido até entre 0,05-3,0 mm, preferencialmente 0,1-0,5 mm, ou tal que pelo menos 30%, preferencialmente pelo menos 50%, mais preferencialmente 70%, ainda mais preferencialmente pelo menos 90% do material contendo amido passe através de um crivo com uma peneira de 0,05-3,0 mm, preferencialmente tela de 0,1-0,5 mm.

[0084] Após ser sujeito a um processo da invenção, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou, preferencialmente, pelo menos 99% dos sólidos secos no material contendo amido são convertidos em um hidrolisado de amido solúvel.

[0085] Em uma modalidade, o tamanho das partículas é mais pequeno do que uma tela # 7, p.ex., uma tela # 6. Uma tela # 7 é usualmente usada em processos da técnica prévia convencionais.

Alfa-amilase presente e/ou adicionada na liquefação

[0086] As alfa-amilases para uso em liquefação são preferencialmente alfa-amilases estáveis ácidas bacterianas. Particularmente, a alfa-amilase é de uma *Exiguobacterium* sp. ou uma *Bacillus* sp. tal como, p.ex., *Bacillus stearothermophilus* ou *Bacillus licheniformis*.

[0087] Em uma modalidade, a alfa-amilase é do gênero *Bacillus*, tal como uma estipe de *Bacillus stearothermophilus*, em particular uma variante de uma alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus*, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 3 em WO 99/019467 ou SEQ ID NO: 12 aqui.

[0088] Em uma modalidade, a alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus* tem uma deleção dupla de dois aminoácidos na região da posição 179 a 182, mais particularmente uma deleção dupla nas posições I181 + G182, R179 + G180, G180 + I181, R179 + I181 ou G180 + G182, preferencialmente I181 + G182 e, opcionalmente, uma substituição N193F (usando SEQ ID NO: 12 para numeração).

[0089] Em uma modalidade, a alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus* tem uma substituição na posição S242, preferencialmente substituição S242Q.

[0090] Em uma modalidade, a alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus* tem uma substituição na posição E188, preferencialmente substitui-

ção E188P.

[0091] Em uma modalidade, a alfa-amilase é selecionada do grupo de variantes de alfa-amilases de *Bacillus stearothermophilus* com as seguintes mutações:

- I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E;

-

I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y
+K220P+N224L

+Q254S;

- I181*+G182*+N193F +V59A Q89R+ E129V+ K177L+
R179E+ Q254S+ M284V; e

-

I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (usando SEQ ID NO: 12 para numeração).

[0092] Em uma modalidade, a variante de alfa-amilase tem pelo menos 75% de identidade, preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 91%, mais preferencialmente pelo menos 92%, ainda mais preferencialmente pelo menos 93%, o mais preferencialmente pelo menos 94% e, ainda o mais preferencialmente, pelo menos 95%, tal como mesmo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, mas menos do que 100% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 12.

[0093] Deve ser entendido que quando se faz referência a alfa-amilases de *Bacillus stearothermophilus* e suas variantes elas são normalmente produzidas na forma truncada. Em particular, o truncamento pode ser tal que a alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus* mostrada em SEQ ID NO: 3 em WO 99/19467 ou SEQ ID NO: 12 aqui, ou suas variantes, seja truncada no terminal C preferencialmente para ter em torno de 490 aminoácidos, tal

como de 482-493 aminoácidos. Preferencialmente, a alfa-amilase variante de *Bacillus stearothermophilus* é truncada, preferencialmente após a posição 484 de SEQ ID NO: 12, particularmente após a posição 485, particularmente após a posição 486, particularmente após a posição 487, particularmente após a posição 488, particularmente após a posição 489, particularmente após a posição 490, particularmente após a posição 491, particularmente após a posição 492, mais particularmente após a posição 493.

Glucoamilase Presente E/Ou Adicionada Na Sacarificação E/Ou Fermentação

[0094] A enzima geradora de fonte de carboidratos presente durante a sacarificação pode em uma modalidade ser uma glucoamilase. Uma glucoamilase está presente e/ou é adicionada na sacarificação e/ou fermentação, preferencialmente sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), em um processo da invenção (i.e., sacarificação e fermentação de material de amido não gelatinizado ou gelatinizado).

[0095] Em uma modalidade, a glucoamilase presente e/ou adicionada na sacarificação e/ou fermentação é de origem fúngica, preferencialmente de uma estirpe de *Aspergillus*, preferencialmente *A. niger*, *A. awamori* ou *A. oryzae*; ou uma estirpe de *Trichoderma*, preferencialmente *T. reesei*; ou uma estirpe de *Talaromyces*, preferencialmente *T. emersonii* ou uma estirpe de *Trametes*, preferencialmente *T. cingulata*, ou uma estirpe de *Pycnoporus*, preferencialmente *P. sanguineus*, ou uma estirpe de *Gloeophyllum*, tal como *G. serpiarium*, *G. abietinum* ou *G. trabeum*, ou uma estirpe dos *Nigrofomes*.

[0096] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de *Talaromyces*, tal como uma estirpe de *Talaromyces emersonii*, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 8.

[0097] Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

- (i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ

ID NO: 8;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 8.

[0098] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de uma estirpe do gênero *Pycnopus*, em particular uma estirpe de *Pycnopus sanguineus* descrita em WO 2011/066576 (SEQ ID NOs 2, 4 ou 6), tal como aquela mostrada como SEQ ID NO: 4 em WO 2011/066576 ou SEQ ID NO: 9 aqui.

[0099] Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 9;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 9.

[00100] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de uma estirpe do gênero *Gloeophyllum*, tal como uma estirpe de *Gloeophyllum sepiarium* ou *Gloeophyllum trabeum*, em particular uma estirpe de *Gloeophyllum* como descrito em WO 2011/068803 (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16). Em uma modalidade preferencial, a glucoamilase é o *Gloeophyllum sepiarium* mostrado em SEQ ID NO: 2 em WO 2011/068803.

[00101] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de *Gloeophyllum sepiarium*, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 10.

[00102] Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 10;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 10.

[00103] Em outra modalidade, a glucoamilase é derivada de *Gloeophyllum trabeum* tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 11. Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 11;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 11.

[00104] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de Trametes, tal como uma estirpe de Trametes cingulata, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 7.

[00105] Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 7;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de ami-

noácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 7.

[00106] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de uma estirpe do gênero *Nigrofomes*, em particular uma estirpe de *Nigrofomes sp.* divulgada em WO 2012/064351.

[00107] As glucoamilases podem em uma modalidade ser adicionadas à sacarificação e/ou fermentação em uma quantidade de 0,0001-20 AGU/g de DS, preferencialmente 0,001-10 AGU/g de DS, especialmente entre 0,01-5 AGU/g de DS, tal como 0,1-2 AGU/g de DS, especialmente 0,1-0,5 AGU/g de DS.

[00108] Composições compreendendo glucoamilase comercialmente disponíveis incluem AMG 200L; AMG 300 L; SANTM SUPER, SANTM EXTRA L, SPIRIZYMETM PLUS, SPIRIZYMETM FUEL, SPIRIZYMETM B4U, SPIRIZYMETM ULTRA, SPIRIZYMETM EXCEL e AMGTM E (a partir da Novozymes A/S); OPTIDEXTM 300, GC480, GC417 (a partir da DuPont.); AMIGASETM e AMIGASETM PLUS (a partir da DSM); G-ZYMETM G900, G-ZYMETM e G990 ZR (a partir da DuPont).

[00109] De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, a glucoamilase está presente e/ou é adicionada na sacarificação e/ou fermentação em combinação com uma alfa-amilase. Exemplos de alfa-amilase adequadas são descritos em baixo.

Alfa-Amilase Presente e/ou Adicionada Na Sacarificação E/Ou Fermentação

[00110] Em uma modalidade, uma alfa-amilase está presente e/ou é adicionada na sacarificação e/ou fermentação nos processos da invenção. Em uma modalidade preferencial, a alfa-amilase é de origem fúngica ou bacteria-

na. Em uma modalidade preferencial, a alfa-amilase é uma alfa-amilase estável ácida fúngica. Uma alfa-amilase estável ácida fúngica é uma alfa-amilase que tem atividade na gama de pH de 3,0 a 7,0 e, preferencialmente, na gama de pH de 3,5 a 6,5, incluindo atividade a um pH de cerca de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0.

[00111] Em uma modalidade, a alfa-amilase é derivada do gênero *Aspergillus*, especialmente uma estirpe de *A. terreus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori* ou *Aspergillus kawachii* ou do gênero *Rhizomucor*, preferencialmente uma estirpe o *Rhizomucor pusillus* ou do gênero *Meripilus*, preferencialmente uma estirpe de *Meripilus giganteus*.

[00112] Em uma modalidade preferencial, a alfa-amilase presente e/ou adicionada na sacarificação e/ou fermentação é derivada de uma estirpe do gênero *Rhizomucor*, preferencialmente uma estirpe de *Rhizomucor pusillus*, tal como uma mostrada em SEQ ID NO: 3 em WO 2013/006756, tal como um híbrido de alfa-amilase de *Rhizomucor pusillus* tendo um ligante de *Aspergillus niger* e domínio de ligação ao amido, tal como aquele mostrado em SEQ ID NO: 6 aqui ou uma sua variante.

[00113] Em uma modalidade, a alfa-amilase presente e/ou adicionada na sacarificação e/ou fermentação é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma alfa-amilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 6;

(ii) uma alfa-amilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 6.

[00114] Em uma modalidade preferencial, a alfa-amilase é uma variante da alfa-amilase mostrada em SEQ ID NO: 6 tendo pelo menos uma das se-

guintes substituições ou combinações de substituições: D165M; Y141W; Y141R; K136F; K192R; P224A; P224R; S123H + Y141W; G20S + Y141W; A76G + Y141W; G128D + Y141W; G128D + D143N; P219C + Y141W; N142D + D143N; Y141W + K192R; Y141W + D143N; Y141W + N383R; Y141W + P219C + A265C; Y141W + N142D + D143N; Y141W + K192R V410A; G128D + Y141W + D143N; Y141W + D143N + P219C; Y141W + D143N + K192R; G128D + D143N + K192R; Y141W + D143N + K192R + P219C; G128D + Y141W + D143N + K192R; ou G128D + Y141W + D143N + K192R + P219C (usando SEQ ID NO: 6 para numeração).

[00115] Em uma modalidade, a alfa-amilase é derivada de um *Rhizomucor pusillus* com um ligante de glucoamilase de *Aspergillus niger* e domínio de ligação ao amido (SBD), preferencialmente divulgada como SEQ ID NO: 6, tendo preferencialmente uma ou mais das seguintes substituições: G128D, D143N, preferencialmente G128D + D143N (usando SEQ ID NO: 6 para numeração), e em que a variante de alfa-amilase presente e/ou adicionada na sacarificação e/ou fermentação tem pelo menos 75% de identidade, preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 91%, mais preferencialmente pelo menos 92%, ainda mais preferencialmente pelo menos 93%, o mais preferencialmente pelo menos 94% e, ainda o mais preferencialmente, pelo menos 95%, tal como mesmo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, mas menos do que 100% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 6 aqui.

[00116] Em uma modalidade preferencial, a razão entre glucoamilase e alfa-amilase presentes e/ou adicionadas durante a sacarificação e/ou fermentação pode estar preferencialmente na gama de 500:1 a 1:1, tal como de 250:1 a 1:1, tal como de 100:1 a 1: 1, tal como de 100: 2 a 100:50, tal como de 100:3 a 100:70.

[00117] Em uma modalidade, a alfa-amilase está presente em uma

quantidade de 0,001 a 10 AFAU/g de DS, preferencialmente 0,01 a 5 AFAU/g de DS, especialmente 0,3 a 2 AFAU/g de DS ou 0,001 a 1 FAU-F/g de DS, preferencialmente 0,01 a 1 FAU-F/g de DS.

[00118] Em uma modalidade adicional, a alfa-amilase e a glucoamilase são adicionadas em uma razão de entre 0,1 e 100 AGU/FAU-F, preferencialmente 2 e 50 AGU/FAU-F, especialmente entre 10 e 40 AGU/FAU-F quando a sacarificação e fermentação são levadas a cabo simultaneamente.

Fermentação

[00119] As condições de fermentação são determinadas com base, p.ex., no tipo de material vegetal, nos açúcares fermentáveis disponíveis, no(s) organismo(s) fermentador(es) e/ou no produto de fermentação desejado. Um perito na técnica pode facilmente determinar condições de fermentação adequadas. A fermentação pode ser levada a cabo em condições convencionalmente usadas. Processos de fermentação preferenciais são processos anaeróbicos.

[00120] Por exemplo, as fermentações podem ser levadas a cabo a temperaturas tão elevadas como 75 °C, p.ex., entre 40-70 °C, tal como entre 50-60 °C. No entanto são também conhecidas bactérias com uma temperatura ótima significativamente mais baixa até em torno da temperatura ambiente (em torno de 20 °C). Exemplos de organismos fermentadores adequados podem ser encontrados na seção “Organismos Fermentadores” acima.

[00121] Para produção de etanol usado levedura, a fermentação pode continuar durante 24 a 96 horas, em particular durante 35 a 60 horas. Em uma modalidade, a fermentação é levada a cabo a uma temperatura entre 20 e 40 °C, preferencialmente 26 a 34 °C, em particular em torno de 32 °C.

[00122] A fermentação pode incluir, adicionalmente a um microrganismo fermentador (p.ex., levedura), nutrientes e enzimas adicionais, incluindo fitases. O uso de levedura em fermentação é bem conhecido na técnica.

[00123] Outros produtos de fermentação podem ser fermentados a

temperaturas conhecidas do perito na técnica como sendo adequadas para o organismo fermentador em questão.

[00124] A fermentação é tipicamente levada a cabo a um pH na gama entre 3 e 7, preferencialmente de pH 3,5 a 6, mais preferencialmente pH 4 a 5. As fermentações continuam tipicamente durante 6-96 horas.

[00125] Os processos da invenção podem ser realizados como um processo descontínuo ou contínuo. As fermentações podem ser conduzidas em um sistema de ultrafiltração em que o retentado é mantido sob recirculação na presença de sólidos, água, e do organismo fermentador, e em que o permeado é o líquido contendo produto de fermentação desejado. São igualmente contemplados métodos/processos conduzidos em reatores de membrana contínuos com membranas de ultrafiltração e onde o retentado é mantido sob recirculação na presença de sólidos, água, e o(s) organismo(s) fermentador(es), e em que o permeado é o líquido contendo produto de fermentação desejado.

[00126] Após fermentação, o organismo fermentador pode ser separado da pasta semifluida fermentada e reciclado.

Materiais Contendo Amido

[00127] Qualquer material de partida contendo amido adequado pode ser usado em um processo da presente invenção. Em uma modalidade, o material contendo amido é amido granular. Em outra modalidade, o material contendo amido é derivado de grão inteiro. O material de partida é geralmente selecionado com base no produto de fermentação desejado. Exemplos de materiais de partida contendo amido, adequados para uso nos processos da presente invenção, incluem cevada, feijões, mandioca, cereais, milho, milo, ervilhas, batatas, arroz, centeio, sagu, sorgo, batatas-doces, tapioca, trigo e grãos inteiros ou qualquer sua mistura. O material contendo amido pode ser também um tipo ceroso ou não ceroso de milho e cevada. Em uma modalidade preferencial, o material contendo amido é milho. Em uma modalidade preferencial, o material contendo amido é trigo.

Produtos de Fermentação

[00128] O termo “produto de fermentação” significa um produto produzido por um método ou processo incluindo fermentação usando um organismo fermentador. Os produtos de fermentação incluem álcoois (p.ex., etanol, metanol, butanol); ácidos orgânicos (p.ex., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacônico, ácido láctico, ácido succínico, ácido glucônico); cetonas (p.ex., acetona); aminoácidos (p.ex., ácido glutâmico); gases (p.ex., H₂ e CO₂); antibióticos (p.ex., penicilina e tetraciclina); enzimas; vitaminas (p.ex., riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); e hormônios. Em uma modalidade preferencial, o produto de fermentação é etanol, p.ex., etanol combustível; etanol potável, *i.e.*, bebidas alcoólicas potáveis; ou etanol industrial ou produtos usados na indústria do álcool consumível (p.ex., cerveja e vinho), indústria dos laticínios (p.ex., produtos lácteos fermentados), indústria das peles e indústria do tabaco. Tipos de cerveja preferenciais compreendem *ales*, *stouts*, *porters*, *lagers*, *bitters*, licores de malte, *happoushu*, cerveja com muito álcool, cerveja com pouco álcool, cerveja baixa em calorias ou cerveja sem álcool. Em uma modalidade preferencial, o produto de fermentação é etanol.

Organismos Fermentadores

[00129] O termo “organismo fermentador” se refere a qualquer organismo, incluindo organismos bacterianos e fúngicos, tais como levedura e fungos filamentosos, adequado para produção de um produto de fermentação desejado. Os organismos fermentadores adequados são capazes de fermentar, *i.e.*, converter, açúcares fermentáveis, tais como arabinose, frutose, glucose, maltose, manose ou xilose, diretamente ou indiretamente no produto de fermentação desejado.

[00130] Exemplos de organismos fermentadores incluem organismos fúngicos tais como levedura. Leveduras preferenciais incluem estirpes de *Saccharomyces*, em particular *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces uvarum*; estirpes de *Pichia*, em particular *Pichia stipitis* tal como *Pichia stipi-*

tis CBS 5773 ou *Pichia pastoris*; estirpes de *Candida*, em particular *Candida arabinofementans*, *Candida boidinii*, *Candida diddensii*, *Candida shehatae*, *Candida sonorensis*, *Candida tropicalis* ou *Candida utilis*. Outros organismos fermentadores incluem estirpes de *Hansenula*, em particular *Hansenula anomala* ou *Hansenula polymorpha*; estirpes de *Kluyveromyces*, em particular *Kluyveromyces fragilis* ou *Kluyveromyces marxianus*; e estirpes de *Schizosaccharomyces*, em particular *Schizosaccharomyces pombe*.

[00131] Organismos fermentadores bacterianos preferenciais incluem estirpes de *Escherichia*, em particular *Escherichia coli*, estirpes de *Zymomonas*, em particular *Zymomonas mobilis*, estirpes de *Zymobacter*, em particular *Zymobacter palmae*, estirpes de *Klebsiella* em particular *Klebsiella oxytoca*, estirpes de *Leuconostoc*, em particular *Leuconostoc mesenteroides*, estirpes de *Clostridium*, em particular *Clostridium butyricum*, estirpes de *Enterobacter*, em particular *Enterobacter aerogenes*, e estirpes de *Thermoanaerobacter*, em particular *Thermoanaerobacter BG1L1* (Appl. Microbiol. Biotech. 77: 61-86), *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter mathranii* ou *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*. Estirpes de *Lactobacillus* são também pretendidas como o são estirpes de *Corynebacterium glutamicum* R, *Bacillus thermoglucosidans* e *Geobacillus thermoglucosidans*.

[00132] Em uma modalidade, o organismo fermentador é um organismo fermentador de açúcares C6, tal como uma estirpe de, p.ex., *Saccharomyces cerevisiae*.

[00133] Em uma modalidade, o organismo fermentador é um organismo fermentador de açúcares C5, tal como uma estirpe de, p.ex., *Saccharomyces cerevisiae*.

[00134] A quantidade de levedura iniciadora empregue na fermentação é uma quantidade eficaz para produzir uma quantidade comercialmente significativa de etanol em uma quantidade de tempo adequado (p.ex., para produzir pelo menos 10% de etanol a partir de um substrato tendo entre 25-40% de DS

em menos do que 72 horas). As células de levedura são geralmente fornecidas em quantidades de cerca de 10^4 a cerca de 10^{12} e, preferencialmente, de cerca de 10^7 a cerca de 10^{10} , especialmente cerca de 5×10^7 contagens de leveduras viáveis por mL de caldo de fermentação. Após levedura ser adicionada ao purê é tipicamente sujeita a fermentação durante cerca de 24-96 horas, p.ex., 35-60 horas. A temperatura é entre cerca de 26-34 °C, tipicamente a cerca de 32 °C, e o pH é de pH 3-6, p.ex., em torno de pH 4-5.

[00135] A levedura é o organismo fermentador preferencial para fermentação do etanol. São preferenciais estirpes de *Saccharomyces*, especialmente estirpes da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, preferencialmente estirpes que são resistentes a elevados níveis de etanol, i.e., até, p.ex., cerca de 10, 12, 15 ou 20 % por vol. ou mais de etanol.

[00136] Em uma modalidade, a levedura utilizadora de C5 é uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* divulgada em WO 2004/085627.

[00137] Em uma modalidade, o organismo fermentador é uma célula microbiana eucariótica C5 mostrada em WO 2010/074577 (Nedalco).

[00138] Em uma modalidade, o organismo fermentador é uma célula eucariótica C5 transformada capaz de isomerizar diretamente xilose em xilulose divulgada em US 2008/0014620.

[00139] Em uma modalidade, o organismo fermentador é uma célula fermentadora de açúcares C5 divulgada em WO 2009/109633.

[00140] Leveduras comercialmente disponíveis incluem LNF SA-1, LNF BG-1, LNF PE-2 e LNF CAT-1 (disponíveis a partir da LNF Brazil), leveduras RED STAR™ e ETHANOL RED™ (disponíveis a partir da Fermentis/Lesaffre, EUA), FALI (disponível a partir da Fleischmann's Yeast, EUA), leveduras frescas SUPERSTART e THERMOSACC™ (disponíveis a partir da Ethanol Technology, WI, EUA), BIOFERM AFT e XR (disponíveis a partir da NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EUA), GERT STRAND (disponível a partir da Gert Strand AB, Suécia) e FERMIOL (dis-

ponível a partir da DSM Specialties).

[00141] O organismo fermentador capaz de produzir um produto de fermentação desejado a partir de açúcares fermentáveis é preferencialmente cultivado sob condições precisas a uma taxa de crescimento particular. Quando o organismo fermentador é introduzido no/adicionado ao meio de fermentação, o organismo fermentador inoculado passa através de um número de etapas. Inicialmente não ocorre crescimento. Este período é referido como a “fase de latência” e pode ser considerado um período de adaptação. Durante a próxima fase referida como a “fase exponencial”, a taxa de crescimento aumenta gradualmente. Após um período de crescimento máximo, a taxa cessa e o organismo fermentador entra na “fase estacionária”. Após um período de tempo adicional, o organismo fermentador entra na “fase de morte” onde o número de células viáveis declina.

Recuperação

[00142] Subsequente à fermentação, o produto de fermentação pode ser separado do meio de fermentação. Assim, em uma modalidade, o produto de fermentação é recuperado após fermentação. O meio de fermentação pode ser destilado para extrair o produto de fermentação desejado ou o produto de fermentação desejado pode ser extraído do meio de fermentação por técnicas de microfiltração ou filtração por membranas. Alternativamente, o produto de fermentação pode ser recuperado por separação. Métodos para recuperação são bem conhecidos na técnica.

Composições de Enzimas

[00143] A presente invenção se relaciona também com uma composição compreendendo uma mistura de endo-protease e exo-protease, e em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da protease na mistura em uma base de proteína de enzima protease total, tal como pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%,

pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, particularmente pelo menos 75%, mais particularmente a exo-protease constitui de entre 5 e 95% (p/p) da protease na mistura em uma base de proteína de enzima protease total, particularmente 10 e 80% (p/p), particularmente 15 e 70% (p/p), mais particularmente 20 e 60% (p/p) e, ainda mais particularmente, 25 e 50% (p/p) da mistura de proteases na composição em uma base de proteína de enzima protease total.

[00144] Em uma modalidade, a endo-protease é derivada de proteases pertencendo à família S53, S8, M35 ou A1 e a exo-protease é derivada de proteases pertencendo à família S10, S53, M14 ou M28.

[00145] A endo-protease é preferencialmente selecionada da família M35, mais particularmente protease M35 derivada de *Thermoascus aurantiacus*.

[00146] Em uma modalidade particular, a metaloprotease M35 é derivada de *Thermoascus aurantiacus*, tal como, p.ex., o polipeptídeo maduro que compreende os aminoácidos 1-177 de SEQ ID NO: 1 ou um polipeptídeo tendo pelo menos 75% de identidade, preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 91%, mais preferencialmente pelo menos 92%, ainda mais preferencialmente pelo menos 93%, o mais preferencialmente pelo menos 94% e, ainda o mais preferencialmente, pelo menos 95%, tal como mesmo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 1.

[00147] A exo-protease é preferencialmente selecionada de uma protease pertencendo à família S10, S53, M14, M28, particularmente exo-protease S53 de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Thermoascus* ou *Thermomyces*, particularmente *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Thermoascus thermophilus* ou *Thermomyces lanuginosus*.

[00148] Em uma modalidade específica, a exo-protease S53 é um poli-

peptídeo tendo atividade de serina protease, selecionado de um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2 ou o polipeptídeo de SEQ ID NO: 3.

[00149] Em outra modalidade específica, a exo-protease S53 é um polipeptídeo tendo atividade de serina protease, selecionado de um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 4.

[00150] Em uma modalidade particular, a endo-protease é uma protease S53 de *Thermoascus aurantiacus*, tal como aquela divulgada em SEQ ID NO: 1, e a exo-protease é uma protease S53 de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Thermoascus* ou *Thermomyces*, particularmente *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 3 e 4.

[00151] As composições podem compreender as proteases como os principais componentes enzimáticos. Alternativamente, as composições podem compreender múltiplas atividades enzimáticas, tais como a endo-protease/exo-protease e uma ou mais (p.ex., várias) enzimas selecionadas do grupo consistindo em hidrolase, isomerase, ligase, liase, oxidorreductase ou transferase, p.ex., uma alfa-galactosidase, alfa-glucosidase, aminopeptidase, alfa-amilase, beta-amilase, pululanase, beta-galactosidase, beta-glucosidase, beta-xilosidase, carboidrase, carboxipeptidase, catalase, celobiohidrolase, celulase, quitinase, cutinase, ciclodextrina glicosiltransferase, desoxirribonuclease, endoglucanase, esterase, glucoamilase, invertase, lacase, lipase, manosidase, mutanase, oxidase, enzima pectinolítica, peroxidase, fitase, polifenoloxidase, protease, ribonuclease, transglutaminase ou xilanase. Em uma

modalidade, a composição compreende adicionalmente uma enzima geradora de fonte de carboidratos e opcionalmente uma alfa-amilase. Em uma modalidade particular, a enzima geradora de fonte de carboidratos é selecionada do grupo consistindo em glucoamilase, alfa-glicosidase, amilase maltogênica, pululanase e beta-amilase.

[00152] Em particular, a enzima geradora de fonte de carboidratos é uma glucoamilase e está presente em uma quantidade de 0,001 a 10 AGU/g de DS, preferencialmente de 0,01 a 5 AGU/g de DS, especialmente 0,1 a 0,5 AGU/g de DS.

[00153] Em uma modalidade, a glucoamilase compreendida na composição é de origem fúngica, preferencialmente derivada de uma estirpe de *Aspergillus*, preferencialmente *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus awamori*, uma estirpe de *Trichoderma*, especialmente *T. reesei*, uma estirpe de *Talaromyces*, especialmente *Talaromyces emersonii*; ou uma estirpe de *Athelia*, especialmente *Athelia rolfsii*; uma estirpe de *Trametes*, preferencialmente *Trametes cingulata*; uma estirpe do gênero *Gloeophyllum*, p.ex., uma estirpe de *Gloeophyllum sepiarium* ou *Gloeophyllum trabeum*; uma estirpe do gênero *Pycnoporus*, p.ex., uma estirpe de *Pycnoporus sanguineus*; ou uma estirpe dos *Nigrofomes* ou uma sua mistura.

[00154] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de *Trametes*, tal como uma estirpe de *Trametes cingulata*, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 7.

[00155] Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 7;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo

menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 7.

[00156] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de *Talaromyces*, tal como uma estirpe de *Talaromyces emersonii*, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 8,

[00157] Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 8;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 8.

[00158] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de uma estirpe do gênero *Pycnoporus*, em particular uma estirpe de *Pycnoporus sanguineus* descrita em WO 2011/066576 (SEQ ID NOs 2, 4 ou 6), tal como aquela mostrada como SEQ ID NO: 4 em WO 2011/066576.

[00159] Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 9;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade

com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 9.

[00160] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de uma estirpe do gênero *Gloeophyllum*, tal como uma estirpe de *Gloeophyllum sepiarium* ou *Gloeophyllum trabeum*, em particular uma estirpe de *Gloeophyllum* como descrito em WO 2011/068803 (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16). Em uma modalidade preferencial, a glucoamilase é o *Gloeophyllum sepiarium* mostrado em SEQ ID NO: 2 em WO 2011/068803.

[00161] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de *Gloeophyllum sepiarium*, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 10.

[00162] Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 10;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 10.

[00163] Em outra modalidade, a glucoamilase é derivada de *Gloeophyllum trabeum* tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 11.

[00164] Em uma modalidade, a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 11;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos

96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 11.

[00165] Em uma modalidade, a glucoamilase é derivada de uma estirpe do gênero *Nigrofores*, em particular uma estirpe de *Nigrofores* sp. divulgada em WO 2012/064351.

[00166] As glucoamilases podem em uma modalidade ser adicionadas à sacarificação e/ou fermentação em uma quantidade de 0,0001-20 AGU/g de DS, preferencialmente 0,001-10 AGU/g de DS, especialmente entre 0,01-5 AGU/g de DS, tal como 0,1-2 AGU/g de DS.

[00167] Composições compreendendo glucoamilase comercialmente disponíveis incluem AMG 200L; AMG 300 L; SANTM SUPER, SANTM EXTRA L, SPIRIZYMETM PLUS, SPIRIZYMETM FUEL, SPIRIZYMETM B4U, SPIRIZYMETM ULTRA, SPIRIZYMETM EXCEL e AMGTM E (a partir da Novozymes A/S); OPTIDEXTM 300, GC480, GC417 (a partir da DuPont.); AMIGASETM e AMIGASETM PLUS (a partir da DSM); G-ZYMETM G900, G-ZYMETM e G990 ZR (a partir da DuPont).

[00168] Adicionalmente a uma glucoamilase, a composição pode compreender adicionalmente uma alfa-amilase. Particularmente, a alfa-amilase é uma alfa-amilase fúngica ácida. Uma alfa-amilase estável ácida fúngica é uma alfa-amilase que tem atividade na gama de pH de 3,0 a 7,0 e, preferencialmente, na gama de pH de 3,5 a 6,5, incluindo atividade a um pH de cerca de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0.

[00169] Preferencialmente, a alfa-amilase fúngica ácida é derivada do gênero *Aspergillus*, especialmente uma estirpe de *A. terreus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori* ou *Aspergillus kawachii* ou do gênero *Rhizomucor*, preferencialmente uma estirpe de *Rhizomucor pusillus* ou do gênero *Meripilus*, preferencialmente uma estirpe de *Meripilus giganteus*.

[00170] Em uma modalidade preferencial, a alfa-amilase é derivada de uma estirpe do gênero *Rhizomucor*, preferencialmente uma estirpe de *Rhizo-*

mucor pusillus, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 3 em WO 2013/006756, tal como um híbrido de alfa-amilase de *Rhizomucor pusillus* tendo um ligante de *Aspergillus niger* e domínio de ligação ao amido, tal como aquele mostrado em SEQ ID NO: 6 aqui ou uma sua variante.

[00171] Em uma modalidade, a alfa-amilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma alfa-amilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 6;

(ii) uma alfa-amilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 6.

[00172] Em uma modalidade preferencial, a alfa-amilase é uma variante da alfa-amilase mostrada em SEQ ID NO: 9 tendo pelo menos uma das seguintes substituições ou combinações de substituições: D165M; Y141W; Y141R; K136F; K192R; P224A; P224R; S123H + Y141W; G20S + Y141W; A76G + Y141W; G128D + Y141W; G128D + D143N; P219C + Y141W; N142D + D143N; Y141W + K192R; Y141W + D143N; Y141W + N383R; Y141W + P219C + A265C; Y141W + N142D + D143N; Y141W + K192R V410A; G128D + Y141W + D143N; Y141W + D143N + P219C; Y141W + D143N + K192R; G128D + D143N + K192R; Y141W + D143N + K192R + P219C; G128D + Y141W + D143N + K192R; ou G128D + Y141W + D143N + K192R + P219C (usando SEQ ID NO: 6 para numeração).

[00173] Em uma modalidade, a alfa-amilase é derivada de um *Rhizomucor pusillus* com um ligante de glucoamilase de *Aspergillus niger* e domínio de ligação ao amido (SBD), preferencialmente divulgada como SEQ ID NO: 6, tendo preferencialmente uma ou mais das seguintes substituições:

G128D, D143N, preferencialmente G128D + D143N (usando SEQ ID NO: 6 para numeração), e em que a variante de alfa-amilase tem pelo menos 75% de identidade, preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 91%, mais preferencialmente pelo menos 92%, ainda mais preferencialmente pelo menos 93%, o mais preferencialmente pelo menos 94% e, ainda o mais preferencialmente, pelo menos 95%, tal como mesmo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, mas menos do que 100% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 6.

[00174] Em uma modalidade preferencial, a razão entre glucoamilase e alfa-amilase presentes e/ou adicionadas durante a sacarificação e/ou fermentação pode estar preferencialmente na gama de 500:1 a 1:1, tal como de 250:1 a 1:1, tal como de 100:1 a 1: 1, tal como de 100: 2 a 100:50, tal como de 100:3 a 100:70.

[00175] As composições podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos na técnica e podem estar na forma de uma composição líquida ou seca. Por exemplo, a composição pode estar na forma de granulado ou microgranulado. A variante pode ser estabilizada de acordo com métodos conhecidos na técnica.

[00176] As composições podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos na técnica e podem estar na forma de uma composição líquida ou seca. As composições podem ser estabilizadas de acordo com métodos conhecidos na técnica.

[00177] A composição de enzimas da presente invenção pode estar em qualquer forma adequada para uso, tal como, por exemplo, um caldo de fermentação em bruto com ou sem células removidas, um lisado de células com ou sem detritos celulares, uma composição de enzimas semipurificada ou purificada ou uma célula hospedeira, como uma fonte das enzimas.

[00178] A composição de enzimas pode ser um pó ou granulado seco,

um granulado sem formação de poeira, um líquido, um líquido estabilizado, ou uma enzima protegida estabilizada. As composições de enzimas líquidas podem, por exemplo, ser estabilizadas por adição de estabilizantes tais como um açúcar, um álcool de açúcar ou outro poliol e/ou ácido láctico ou outro ácido orgânico de acordo com processos estabelecidos.

Usos da composição de acordo com a invenção

[00179] As composições de acordo com a invenção são contempladas para uso na sacarificação do amido. Em um aspecto, a presente invenção se relaciona assim com um uso da composição de acordo com a presente invenção na sacarificação de um material contendo amido.

[00180] Em uma modalidade, o uso compreende adicionalmente fermentação do material contendo amido sacarificado para produzir um produto de fermentação. O material de amido pode ser amido gelatinizado ou não gelatinizado. Particularmente, o produto de fermentação é álcool, mais particularmente etanol.

[00181] Em uma modalidade particular, a sacarificação e a fermentação são realizadas simultaneamente.

[00182] A invenção é adicionalmente divulgada na lista em baixo de modalidades preferenciais.

[00183] Modalidade 1. Um processo para produção de um produto de fermentação a partir de material contendo amido compreendendo:

a) sacarificação do material contendo amido a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização inicial do referido material contendo amido usando uma enzima geradora de fonte de carboidratos; e

b) fermentação usando um organismo fermentador; em que os passos a) e/ou b) são realizados na presença de uma mistura de endo-protease e exo-protease, e em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total.

[00184] Modalidade 2. Um processo para produção de um produto de fermentação a partir de material contendo amido compreendendo os passos de:

(a) liquefação do material contendo amido a uma temperatura acima da temperatura de gelatinização inicial do referido material contendo amido na presença de uma alfa-amilase;

(b) sacarificação do material liquefeito obtido no passo (a) usando uma enzima geradora de fonte de carboidratos;

(c) fermentação usando um organismo fermentador;

em que os passos b) e/ou c) são realizados na presença de uma mistura de endo-protease e exo-protease, e em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total.

[00185] Modalidade 3. O processo de acordo com as modalidades 1 ou 2, em que a sacarificação e a fermentação são realizadas simultaneamente.

[00186] Modalidade 4. O processo de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, em que a exo-protease constitui pelo menos 10% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total, tal como pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, particularmente pelo menos 75%, mais particularmente a exo-protease constitui de entre 5 e 95% (p/p) em uma base de proteína de enzima protease total, particularmente 10 e 80% (p/p), particularmente 15 e 70% (p/p), mais particularmente 20 e 60% (p/p) e, ainda mais particularmente, 25 e 50% (p/p) da mistura de proteases na composição em uma base de proteína de enzima protease total.

[00187] Modalidade 5. O processo de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, em que a endo-protease e a exo-protease estão pre-

sentes em uma razão de 5:2 microgramas de proteína de enzima (EP)/g de sólidos secos (DS), particularmente 5:3, mais particularmente 5:4.

[00188] Modalidade 6. O processo de acordo com qualquer uma das modalidades 1-5, em que a endo-protease é derivada de proteases pertencendo à família S53, S8, M35, A1.

[00189] Modalidade 7. O processo de acordo com qualquer uma das modalidades 1-5, em que a exo-protease é derivada de proteases pertencendo à família S10, S53, M14, M28.

[00190] Modalidade 8. O processo da modalidade 7, em que a endo-protease é selecionada da família M35, mais particularmente protease M35 derivada de *Thermoascus aurantiacus*, o polipeptídeo maduro da qual compreende os aminoácidos 1-177 de SEQ ID NO: 1 ou um polipeptídeo tendo pelo menos 75% de identidade, preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 91%, mais preferencialmente pelo menos 92%, ainda mais preferencialmente pelo menos 93%, o mais preferencialmente pelo menos 94% e, ainda o mais preferencialmente, pelo menos 95%, tal como mesmo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 1.

[00191] Modalidade 9. O processo de acordo com a modalidade 8, em que a exo-protease S53 é derivada de uma estirpe de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Thermoascus*, or *Thermomyces*, particularly *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Thermoascus thermophilus* ou *Thermomyces lanuginosus*.

[00192] Modalidade 10. O processo de acordo com a modalidade 9, em que a protease S53 é um polipeptídeo tendo atividade de serina protease, selecionado de um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%,

pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2 ou o polipeptídeo de SEQ ID NO: 3.

[00193] Modalidade 11. O processo de acordo com a modalidade 9, em que a protease S53 é um polipeptídeo tendo atividade de serina protease, selecionado de um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 4.

[00194] Modalidade 12. O processo de acordo com qualquer uma das modalidades precedentes, em que uma alfa-amilase está presente ou é adicionada durante a sacarificação e/ou fermentação.

[00195] Modalidade 13. O processo de acordo com a modalidade 12, em que a alfa-amilase é uma alfa-amilase ácida, preferencialmente uma alfa-amilase fúngica ácida.

[00196] Modalidade 14. O processo de acordo com a modalidade 13, em que a alfa-amilase é derivada do gênero *Aspergillus*, especialmente uma estirpe de *A. terreus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori* ou *Aspergillus kawachii* ou do gênero *Rhizomucor*, preferencialmente uma estirpe o *Rhizomucor pusillus* ou do gênero *Meripilus*, preferencialmente uma estirpe de *Meripilus giganteus*.

[00197] Modalidade 15. O processo de acordo com a modalidade 14, em que a alfa-amilase presente na sacarificação e/ou fermentação é derivada de uma estirpe do gênero *Rhizomucor*, preferencialmente uma estirpe de *Rhizomucor pusillus*, tal como um híbrido de alfa-amilase de *Rhizomucor pusillus* tendo um ligante e domínio de ligação ao amido de uma glucoamilase de *Aspergillus niger*.

[00198] Modalidade 16. O processo da modalidades 15, em que a alfa-amilase presente na sacarificação e/ou fermentação é selecionada do grupo

consistindo em:

(i) uma alfa-amilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 6;

(ii) uma alfa-amilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 6.

[00199] Modalidade 17. O processo da modalidade 16, em que a alfa-amilase é derivada de um *Rhizomucor pusillus* com um ligante de glucoamilase e domínio de ligação ao amido (SBD) de *Aspergillus niger*, preferencialmente divulgada como SEQ ID NO: 6, tendo preferencialmente uma ou mais das seguintes substituições: G128D, D143N, preferencialmente G128D + D143N.

[00200] Modalidade 18. O processo de qualquer uma das modalidades 12-17, em que a alfa-amilase está presente em uma quantidade de 0,001 a 10 AFAU/g de DS, preferencialmente 0,01 a 5 AFAU/g de DS, especialmente 0,3 a 2 AFAU/g de DS ou 0,001 a 1 FAU-F/g de DS, preferencialmente 0,01 a 1 FAU-F/g de DS.

[00201] Modalidade 19. O processo de qualquer uma das modalidades 1-18, em que a enzima geradora de fonte de carboidratos é selecionada do grupo consistindo em glucoamilase, alfa-glicosidase, amilase maltogênica, pululanase e beta-amilase.

[00202] Modalidade 20. O processo de qualquer uma das modalidades 1-19, em que a enzima geradora de fonte de carboidratos é uma glucoamilase e está presente em uma quantidade de 0,001 a 10 AGU/g de DS, preferencialmente de 0,01 a 5 AGU/g de DS, especialmente 0,1 a 0,5 AGU/g de DS.

[00203] Modalidade 21. O processo de qualquer uma das modalidades

18-20, em que a alfa-amilase e a glucoamilase são adicionadas em uma razão de entre 0,1 e 100 AGU/FAU-F, preferencialmente 2 e 50 AGU/FAU-F, especialmente entre 10 e 40 AGU/FAU-F quando a sacarificação e fermentação são levadas a cabo simultaneamente.

[00204] Modalidade 22. O processo de qualquer uma das modalidades 19-21, em que a glucoamilase é derivada de uma estirpe de *Aspergillus*, preferencialmente *Aspergillus niger* ou *Aspergillus awamori*, uma estirpe de *Talaromyces*, especialmente *Talaromyces emersonii*; ou uma estirpe de *Athelia*, especialmente *Athelia rolfsii*; uma estirpe de *Trametes*, preferencialmente *Trametes cingulata*; uma estirpe do gênero *Gloeophyllum*, p.ex., uma estirpe de *Gloeophyllum sepiarium* ou *Gloeophyllum trabeum*; uma estirpe do gênero *Pycnoporus*, p.ex., uma estirpe de *Pycnoporus sanguineus*; ou uma sua mistura.

[00205] Modalidade 23. O processo da modalidade 22, em que a glucoamilase é derivada de *Trametes*, tal como uma estirpe de *Trametes cingulata*, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 7.

[00206] Modalidade 24. O processo da modalidade 23, em que a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 7;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 7.

[00207] Modalidade 25. O processo da modalidade 22, em que a glucoamilase é derivada de *Talaromyces*, tal como uma estirpe de *Talaromyces emersonii*, tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 8.

[00208] Modalidade 26. O processo da modalidade 25, em que a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 8;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 8.

[00209] Modalidade 27. O processo da modalidade 22, em que a glucoamilase é derivada de uma estirpe do gênero *Pycnoporus*, tal como uma estirpe de *Pycnoporus sanguineus* tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 9.

[00210] Modalidade 28. O processo da modalidade 27, em que a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 9;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 9.

[00211] Modalidade 29. O processo da modalidade 22, em que a glucoamilase é derivada de uma estirpe do gênero *Gloeophyllum*, tal como uma estirpe de *Gloeophyllum sepiarium* mostrada em SEQ ID NO: 10.

[00212] Modalidade 30. O processo da modalidade 29, em que a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ

ID NO: 10;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 10.

[00213] Modalidade 31. O processo da modalidade 22, em que a glucoamilase é derivada de uma estirpe do gênero *Gloeophyllum*, tal como uma estirpe de *Gloeophyllum trabeum* tal como aquela mostrada em SEQ ID NO: 11.

[00214] Modalidade 32. O processo da modalidade 22, em que a glucoamilase é selecionada do grupo consistindo em:

(i) uma glucoamilase compreendendo o polipeptídeo de SEQ ID NO: 11;

(ii) uma glucoamilase compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 60%, pelo menos 70%, p.ex., pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 11.

[00215] Modalidade 33. O processo de qualquer uma das modalidades 1-32, em que o produto de fermentação é recuperado após fermentação.

[00216] Modalidade 34. O processo de qualquer uma das modalidades 1-33, em que o produto de fermentação é um álcool, preferencialmente etanol, especialmente etanol para combustível, etanol potável e/ou etanol industrial.

[00217] Modalidade 35. O processo de qualquer uma das modalidades 1-34, em que o organismo fermentador é levedura, preferencialmente uma estirpe de *Saccharomyces*, especialmente uma estirpe de *Saccharomyces cerevi-*

siae.

[00218] Modalidade 36. O processo da modalidade 1, em que o material contendo amido é amido granular.

[00219] Modalidade 37. O processo da modalidade 36, em que o material contendo amido é derivado de grão inteiro.

[00220] Modalidade 38. O processo de qualquer uma das modalidades 1-37, em que o material contendo amido é derivado de milho, trigo, cevada, centeio, milo, sagu, mandioca, tapioca, sorgo, arroz ou batatas.

[00221] Modalidade 39. O processo de qualquer uma das modalidades 1-38, em que a fermentação é levada a cabo a um pH na gama entre 3 e 7, preferencialmente de 3,5 a 6 ou, mais preferencialmente, de 4 a 5.

[00222] Modalidade 40. O processo de qualquer uma das modalidades 1-39, em que o processo é levado a cabo durante entre 1 e 96 horas, preferencialmente é de 6 a 72 horas.

[00223] Modalidade 41. O processo de qualquer uma das modalidades 1-40, em que o conteúdo de sólidos secos do material contendo amido está na gama de 10-55% p/p, preferencialmente 25-45% p/p, mais preferencialmente 30-40% p/p.

[00224] Modalidade 42. O processo de qualquer uma das modalidades 1-41, em que o material contendo amido é preparado por redução do tamanho de partículas do material contendo amido até um tamanho de partículas de 0,1-0,5 mm.

[00225] Modalidade 43. O processo da modalidade 3, em que a temperatura durante a sacarificação e fermentação simultâneas é entre 25 °C e 40 °C, tal como entre 28 °C e 35 °C, tal como entre 30 °C e 34 °C, tal como em torno de 32 °C.

[00226] Modalidade 44. O processo da modalidade 3, em que o pH durante a sacarificação e fermentação simultâneas é seleccionado da gama 3-7, preferencialmente 4,0-6,5, mais particularmente 4,5-5,5, tal como pH 5,0.

[00227] Modalidade 45. O processo de qualquer uma das modalidades 2-44, em que a liquefação é levada a cabo a pH 4,0-6,5, preferencialmente a um pH de 4,5 a 5,5, tal como pH 5,0.

[00228] Modalidade 46. O processo de qualquer uma das modalidades 2-45, em que a temperatura na liquefação está na gama de 70-95 °C, preferencialmente 80-90 °C, tal como em torno de 85 °C.

[00229] Modalidade 47. O processo das modalidades 1 ou 2, compreendendo adicionalmente, antes do passo (a), os passos de:

x) redução do tamanho das partículas do material contendo amido;

y) formação de uma pasta semifluida compreendendo o material contendo amido e água.

[00230] Modalidade 48. O processo de qualquer uma das modalidades 1-47, em que uma pululanase está presente i) durante a fermentação e/ou ii) antes da, durante a e/ou após liquefação.

[00231] Modalidade 49. Uma composição compreendendo uma mistura de endo-protease e exo-protease, e em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da protease na mistura em uma base de proteína de enzima protease total, tal como pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, particularmente pelo menos 75%, mais particularmente a exo-protease constitui de entre 5 e 95% (p/p) da protease na mistura em uma base de proteína de enzima protease total, particularmente 10 e 80% (p/p), particularmente 15 e 70% (p/p), mais particularmente 20 e 60% (p/p) e, ainda mais particularmente, 25 e 50% (p/p) da mistura de proteases na composição em uma base de proteína de enzima protease total.

[00232] Modalidade 50. A composição da modalidade 49, em que a endo-protease é derivada de proteases pertencendo à família S53, S8, M35 ou

A1 e a exo-protease é derivada de proteases pertencendo à família S10, S53, M14 ou M28.

[00233] Modalidade 51. A composição da modalidade 50, em que a endo-protease S53 é um polipeptídeo tendo atividade de serina protease, selecionado de um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[00234] Modalidade 52. A composição de acordo com a modalidade 50, em que a exo-protease S53 é derivada de uma estirpe de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Thermoascus*, or *Thermomyces*, particularly *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Thermoascus thermophilus* ou *Thermomyces lanuginosus*.

[00235] Modalidade 53. A composição de acordo com a modalidade 52, em que a exo-protease S53 é um polipeptídeo tendo atividade de serina protease, selecionado de um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2 ou o polipeptídeo de SEQ ID NO: 3.

[00236] Modalidade 54. A composição de acordo com a modalidade 52, em que a exo-protease S53 é um polipeptídeo tendo atividade de serina protease, selecionado de um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 4.

[00237] Modalidade 55. A composição de qualquer uma das modalida-

des 49-54, compreendendo adicionalmente uma enzima geradora de fonte de carboidratos selecionada do grupo de glucoamilase, alfa-glucosidase, amilase maltogênica e beta-amilase.

[00238] Modalidade 56. A composição da modalidade 55, em que a enzima geradora de fonte de carboidratos é selecionada do grupo de glucoamilases derivadas de uma estirpe de *Aspergillus*, preferencialmente *Aspergillus niger* ou *Aspergillus awamori*, uma estirpe de *Trichoderma*, especialmente *T. reesei*, uma estirpe de *Talaromyces*, especialmente *Talaromyces emersonii*; ou uma estirpe de *Athelia*, especialmente *Athelia rolfsii*; uma estirpe de *Trametes*, preferencialmente *Trametes cingulata*; uma estirpe do gênero *Gloeophyllum*, p.ex., uma estirpe de *Gloeophyllum sepiarium* ou *Gloeophyllum trabeum*; um estirpe do gênero *Pycnoporus*, p.ex., uma estirpe de *Pycnoporus sanguineus*; ou uma sua mistura.

[00239] Modalidade 57. A composição de qualquer uma das modalidades 49-56, compreendendo adicionalmente uma alfa-amilase selecionada do grupo de alfa-amilases fúngicas, preferencialmente derivadas do gênero *Aspergillus*, especialmente uma estirpe de *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori* ou *Aspergillus kawachii* ou do gênero *Rhizomucor*, preferencialmente uma estirpe o *Rhizomucor pusillus* ou do gênero *Meripilus*, preferencialmente uma estirpe de *Meripilus giganteus*.

[00240] Modalidade 58. Um uso da composição de acordo com qualquer uma das modalidades 49-57 na sacarificação de um material contendo amido.

[00241] Modalidade 59. O uso de acordo com a modalidade 58, compreendendo adicionalmente fermentação do material contendo amido sacarificado para produzir um produto de fermentação.

[00242] Modalidade 60. O uso de acordo com qualquer uma das modalidades 58-59, em que o material contendo amido é amido gelatinizado ou não gelatinizado.

[00243] Modalidade 61. O uso de acordo com qualquer uma das modalidades 58-60, em que o produto de fermentação é um álcool, particularmente etanol.

[00244] Modalidade 62. O uso de acordo com qualquer uma das modalidades 58-61, em que a sacarificação e a fermentação são realizadas simultaneamente.

[00245] A presente invenção é adicionalmente descrita pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitando o escopo da invenção.

EXEMPLOS

Ensaio de Enzimas

Ensaio de protease

Ensaio de AZCL-caseína

[00246] Uma solução de 0,2% do substrato azul AZCL-caseína é suspensa em tampão de Bórax/ NaH_2PO_4 pH 9 enquanto se agita. A solução é distribuída enquanto se agita a placa de microtitulação (100 microL em cada poço), 30 microL da amostra de enzima são adicionados e as placas são incubadas em um Termomisturador Eppendorf durante 30 minutos a 45 °C e 600 rpm. A amostra de enzima desnaturada (ebulição a 100 °C durante 20 min) é usada como um branco. Após incubação, a reação é parada por transferência da placa de microtitulação para gelo e a solução colorida é separada do sólido por centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. 60 microL de sobrenadante são transferidos para uma placa de microtitulação e a absorvância a 595 nm é medida usando um Leitor de Microplacas da BioRad.

Ensaio cinético de Suc-AAPF-pNA:

Substrato de pNA: Suc-AAPF-pNA (L-1400 da Bachem).

Temperatura: Temperatura ambiente (25 °C)

Tampões do ensaio: ácido succínico a 100 mM, HEPES a 100 mM, CHES a 100 mM, CABS a 100 mM, CaCl_2 a 1 mM, KCl a 150 mM, Tri-

ton X-100 a 0,01% ajustado até valores de pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 e 11,0 com HCl ou NaOH.

[00247] 20 µL de amostra de protease (diluídos em Triton X-100 a 0,01%) foram misturados com 100 µL de tampão do ensaio. O ensaio foi iniciado por adição de 100 µL de substrato de pNA (50 mg dissolvidos em 1,0 mL de DMSO e adicionalmente diluídos 45x com Triton X-100 a 0,01%). O aumento na OD₄₀₅ foi monitorizado como uma medida da atividade de protease.

Ensaio de ponto final de Suc-AAPF-pNA:

Substrato de pNA: Suc-AAPF-pNA (L-1400 da Bachem).

Temperatura: controlada (temperatura do ensaio).

Tampão do ensaio: ácido succínico a 100 mM, HEPES a 100 mM, CHES a 100 mM, CABS a 100 mM, CaCl₂ a 1 mM, KCl a 150 mM, Triton X-100 a 0,01%, pH 4,0.

[00248] 200 µL de substrato de pNA (50 mg dissolvidos em 1,0 mL de DMSO e adicionalmente diluídos 45x com o tampão do Ensaio) foram pipetados em um tubo Eppendorf e colocados em gelo. 20 µL de amostra de protease (diluída em Triton X-100 a 0,01%) foram adicionados. O ensaio foi iniciado por transferência do tubo Eppendorf para um termomisturador Eppendorf, que estava definido para a temperatura do ensaio. O tubo foi incubado durante 15 minutos no termomisturador Eppendorf à sua taxa de agitação mais elevada (1400 rpm). A incubação foi terminada por transferência do tubo de volta para o banho de gelo e adição de 600 µL de H₃BO₃/NaOH a 500 mM, pH 9,7. O tubo foi misturado e 200 µL da mistura foram transferidos para uma placa de microtitulação, que foi lida à OD₄₀₅. Um tampão cego foi incluído no ensaio (em vez da enzima). OD₄₀₅ (Amostra) – OD₄₀₅ (Cego) foi uma medida da atividade de protease.

Ensaio de Protazyme AK:

Substrato: Comprimido de Protazyme AK (caseína reticulada e

corada; da Megazyme)

Temperatura: controlada (temperatura do ensaio).

Tampão do ensaio: ácido succínico a 100 mM, HEPES a 100 mM, CHES a 100 mM, CABS a 100 mM, CaCl₂ a 1 mM, KCl a 150 Mm, Triton X-100 a 0,01%, pH 6,5.

[00249] Um comprimido de Protazyme AK foi suspenso em 2,0 mL de Triton X-100 a 0,01% por agitação suave. 500 µL desta suspensão e 500 µL de tampão de ensaio foram dispensados em um tubo Eppendorf e colocados em gelo. 20 µL de amostra de protease (diluída em Triton X-100 a 0,01%) foram adicionados. O ensaio foi iniciado por transferência do tubo Eppendorf para um termomisturador Eppendorf, que estava definido para a temperatura do ensaio. O tubo foi incubado durante 15 minutos no termomisturador Eppendorf à sua taxa de agitação mais elevada (1400 rpm). A incubação foi parada por transferência do tubo de volta para o banho de gelo. Depois, o tubo foi centrifugado em uma centrífuga gelada durante alguns minutos e 200 µL de sobrenadante foram transferidos para uma placa de microtitulação, que foi lida à OD₆₅₀. Um tampão cego foi incluído no ensaio (em vez da enzima). OD₆₅₀ (Amostra) – OD₆₅₀ (Cego) foi uma medida da atividade de protease.

Ensaio cinético de Suc-AAPX-pNA:

Substratos de pNA: Suc-AAPA-pNA (L-1775 da Bachem)

Suc-AAPR-pNA (L-1720 da Bachem)

Suc-AAPD-pNA (L-1835 da Bachem)

Suc-AAPI-pNA (L-1790 da Bachem)

Suc-AAPM-pNA (L-1395 da Bachem)

Suc-AAPV-pNA (L-1770 da Bachem)

Suc-AAPL-pNA (L-1390 da Bachem)

Suc-AAPE-pNA (L-1710 da Bachem)

Suc-AAPK-pNA (L-1725 da Bachem)

Suc-AAPF-pNA (L-1400 da Bachem).

[00250] Temperatura: Temperatura ambiente (25 °C)

[00251] Tampão do ensaio: ácido succínico a 100 mM, HEPES a 100 mM, CHES a 100 mM, CABS a 100 mM, CaCl₂ a 1 mM, KCl a 150 mM, Triton X-100 a 0,01%, pH 4,0 ou pH 9,0.

[00252] 20 µL de protease (diluída em Triton X-100 a 0,01%) foram misturados com 100 µL de tampão do ensaio. O ensaio foi iniciado por adição de 100 µL de substrato de pNA (50 mg dissolvidos em 1,0 mL de DMSO e adicionalmente diluídos 45x com Triton X-100 a 0,01%). O aumento na OD₄₀₅ foi monitorizado como uma medida da atividade de protease.

Ensaio de *o*-ftaldialdeído (OPA):

[00253] Este ensaio detecta aminas primárias e conseqüentemente a clivagem de ligações de peptídeo por uma protease pode ser medida como a diferença na absorvância entre uma amostra tratada com protease e uma amostra de controle. O ensaio é conduzido essencialmente de acordo com Nielsen et al. (Nielsen, PM, Petersen, D, Dampmann, C. *Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J Food Sci*, 2001, 66: 642-646).

[00254] 500 µL de amostra são filtrados através de um filtro centrífuga Microcon de 100 kDa (60 minutos, 11.000 rpm, 5 °C). As amostras são diluídas apropriadamente (p.ex., 10, 50 ou 100 vezes) em água desionizada e 25 µL de cada amostra são carregados em uma placa de microtitulação de 96 poços (5 replicados). 200 µL de reagente OPA (tetraborato dissódico decahidratado a 100 mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) a 5,7 mM, di-tiotreitol (DDT) a 3,5 mM, *o*-ftaldialdeído a 6 mM) são dispensados em todos os poços, a placa é agitada (10 seg, 750 rpm) e a absorvância medida a 340 nm.

Ensaio para atividade de glucoamilase

Unidades de glucoamilase, AGU

[00255] A Unidade de Glucoamilase (AGU) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 micromole de maltose por minuto sob as con-

dições padrão (37 °C, pH 4,3, substrato: maltose a 100 mM, tampão: acetato a 0,1 M, tempo de reação 6 minutos como definido na incubação de glucoamilase em baixo), gerando deste modo glucose.

<u>incubação de glucoamilase:</u>	
Substrato:	maltose a 100 mM
Tampão:	acetato a 0,1 M
pH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubação:	37 °C ± 1
Tempo de reação:	6 minutos
Gama de trabalho da enzima:	0,5-4,0 AGU/mL

[00256] O princípio da análise é descrito por 3 passos de reação:

O passo 1 é uma reação de enzima:

[00257] A glucoamilase (AMG), EC 3.2.1.3 (exo-alfa-1,4-glucanogluco-hidrolase), hidrolisa maltose para formar alfa-D-glucose. Após incubação, a reação é parada com NaOH.

Os passos 2 e 3 resultam em uma reação de ponto final:

[00258] A glucose é fosforilada por ATP, em uma reação catalisada por hexocinase. O glucose-6-fosfato formado é oxidado até 6-fosfogluconato por glucose-6-fosfato desidrogenase. Em esta mesma reação, uma quantidade equimolar de NAD⁺ é reduzida até NADH com um aumento resultante na absorbância a 340 nm. Pode ser usado um sistema autoanalisador tal como Analisador Konelab 30 (Thermo Fisher Scientific).

Reação de cor	
Tris	aprox. 35 mM
ATP	0,7 mM
NAD ⁺	0,7 mM
Mg ²⁺	1,8 mM
Hexocinase	> 850 U/L
Glucose-6-P-DH	> 850 U/L
pH	aprox. 7,8
Temperatura	37,0 °C ± 1,0 °C
Tempo de reação	420 seg
Comprimento de onda	340 nm

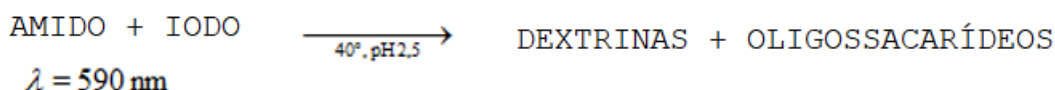
Atividade de alfa-amilase ácida (AFAU)

[00259] A atividade de alfa-amilase ácida pode ser medida em AFAU (Unidades de Alfa-amilase Fúngica Ácida), que são determinadas em relação a um padrão de enzima. 1 AFAU é definido como a quantidade de enzima que

degrada 5,260 mg de matéria seca de amido por hora sob as condições padrão mencionadas em baixo.

[00260] A alfa-amilase ácida, uma endo-alfa-amilase (1,4-alfa-D-glucana-glucano-hidrolase, E.C. 3.2.1.1), hidrolisa ligações alfa-1,4-glucosídicas nas regiões internas da molécula de amido para formar dextrinas e oligossacarídeos com diferentes comprimentos de cadeia. A intensidade da cor formada com iodo é diretamente proporcional à concentração de amido. A atividade de amilase é determinada usando colorimetria reversa como uma redução na concentração de amido sob as condições analíticas especificadas.

ALFA-AMILASE



azul/violeta $t = 23$ segundos descoloração

Condições padrão/condições de reação:

Substrato:	Amido solúvel, aprox. 0,17 g/L
Tampão:	Citrato, aprox. 0,03 M
Iodo (I ₂):	0,03 g/L
CaCl ₂ :	1,85 mM
pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubação:	40 °C
Tempo de reação:	23 segundos
Comprimento de onda:	590 nm
Concentração de enzima:	0,025 AFAU/mL
Gama de trabalho de enzimas:	0,01-0,04 AFAU/mL

[00261] Uma pasta EB-SM-0259.02/01 descrevendo este método analítico em mais detalhe está disponível mediante pedido à Novozymes A/S, Dinamarca, pasta essa que é deste modo incluída por referência.

Determinação de FAU-F

[00262] FAU-F Unidades de Alfa-Amilase Fúngica (Fungamyl) é medida em relação a um padrão de enzima de uma força declarada.

Condições de reação	
Temperatura	37 °C
pH	7,15
Comprimento de onda	405 nm
Tempo de reação	5 min
Tempo de medição	2 min

[00263] Uma pasta (EB-SM-0216.02) descrevendo este método padrão em mais detalhe está disponível mediante pedido à Novozymes A/S, Dina-

marca, pasta essa que é deste modo incluída por referência.

Atividade de Alfa-amilase (KNU)

[00264] A atividade de alfa-amilase pode ser determinada usando amido de batata como substrato. Este método é baseado na desagregação de amido de batata modificado pela enzima, e a reação é seguida por mistura de amostras da solução de amido/enzima com uma solução de iodo. Inicialmente é formada uma cor enegrecida-azul, mas durante a desagregação do amido a cor azul se torna mais fraca e se torna gradualmente em um avermelhado-marrom, que é comparado com um vidro colorido padrão.

[00265] Uma Unidade de alfa-amilase Kilo Novo (KNU) é definida como a quantidade de enzima que, sob condições padrão (*i.e.*, a 37 °C +/- 0,05; Ca²⁺ a 0,0003 M; e pH 5,6) dextriniza 5,260 g de substância seca de amido Merck Amylum solúvel.

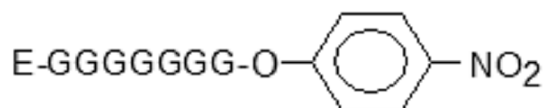
[00266] Uma pasta EB-SM-0009.02/01 descrevendo este método analítico em mais detalhe está disponível mediante pedido à Novozymes A/S, Dinamarca, pasta essa que é deste modo incluída por referência.

Atividade de Alfa-amilase (KNU-A)

[00267] A atividade de alfa-amilase é medida em KNU(A), Quilo Unidades de Novozymes Quilo (A), em relação a um padrão de enzima de uma resistência declarada.

[00268] A alfa-amilase em amostras e a α -glucosidase no estojo de reagentes hidrolisam o substrato (4,6-etilideno(G₇)-*p*-nitrofenil(G₁)- α ,D-maltoheptaosídeo (etilideno-G₇PNP)) em glucose e o *p*-nitrofenol de cor amarela.

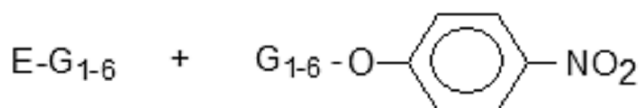
[00269] A taxa de formação de *p*-nitrofenol pode ser observada por Konelab 30. Isto é uma expressão da taxa de reação e deste modo da atividade de enzima.



Etilideno-G₇-p-nitrofenil-malto-heptaosídeo



alfa-Amilase



Etilideno-G_n

G_n-p-nitrofenila



alfa-glucosidase



Glucose

p-Nitrofenol
amarelo, 405 nm

[00270] A enzima é uma alfa-amilase com o número de classificação de enzimas EC 3.2.1.1.

Parâmetro	Condições de reação
Temperatura	37 °C
pH	7,00 (a 37 °C)
Conc. de substrato	Etilideno-G ₇ PNP, R2: 1,86 mM
Conc. da enzima (conc. de padrão elevado/baixo na mistura reacional)	1,35-4,07 KNU(A)/L
Tempo de reação	2 min
Tempo de medição cinética de intervalo	7/18 s
Comprimento de onda	405 nm
Conc. de reagentes/químicos críticos para a análise	α-glucosidase, R1: ≥ 3,39 kU/l

Enzimas

[00271] Alfa-Amilase 369 (AA369): Alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus* com as mutações: I181* + G182* + N193F + V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V truncada até 491 aminoácidos (usando SEQ ID NO: 12 para numeração).

[00272] Alfa-Amilase X: Alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus* com as mutações: I181* + G182* + N193F truncada até 491 aminoácidos (usando SEQ ID NO: 12 para numeração).

[00273] Glucoamilase Po: Parte madura da glucoamilase de *Penicillium oxalicum* divulgada como SEQ ID NO: 2 em WO 2011/127802 e mostrada em SEQ ID NO: 13 aqui.

[00274] Protease Pfu: Protease derivada de *Pyrococcus furiosus* mostrada em SEQ ID NO: 5 aqui.

[00275] Glucoamilase Po 498 (GA498): Variante de glucoamilase de *Penicillium oxalicum* tendo as seguintes mutações: K79V + P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F (usando SEQ ID NO: 13 para numeração).

[00276] Combinação de alfa-amilases A: Combinação compreendendo Alfa-amilase AA369, glucoamilase GA498 e protease PfuS (dosagem: 2,1 µg de EP/g de DS de AA369, 4,5 µg de EP/g de DS de GA498, 0,0385 µg de EP/g de DS de PfuS, onde EP é proteína de enzima e DS é sólidos secos totais).

[00277] Combinação de glucoamilases A: Combinação compreendendo glucoamilase de *Talaromyces emersonii* divulgada como SEQ ID NO: 34 em WO99/28448 e SEQ ID NO: 8 aqui, glucoamilase de *Trametes cingulata* divulgada como SEQ ID NO: 2 em WO 06/69289 e SEQ ID NO: 7 e alfa-amilase de *Rhizomucor pusillus* com ligante de glucoamilase e domínio de ligação ao amido (SBD) de *Aspergillus niger*, divulgada em SEQ ID NO: 6 aqui tendo as seguintes substituições G128D + D143N usando SEQ ID NO: 6 para numeração (a razão de atividade em AGU:AGU:FAU-F é cerca de 29:8:1).

[00278] A metaloprotease da família M35 (AP025) da estirpe de *Thermoascus aurantiacus* no. CGMCC 0670 foi isolada a partir de uma amostra de solo coletada em 21 de julho, 1998 na Província de Yunnan, Xishuangbanna, China. Esta protease foi previamente divulgada em WO 2003/048353 e incluída aqui como SEQ ID NO: 1.

Exemplo 1: Cultura de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC No. 0670

[00279] *Thermoascus aurantiacus* CGMCC No. 0670 foi cultivada a 45 °C durante 60 horas em frascos de agitação com o meio CBH1. O caldo de cultura foi coletado por centrifugação (7000 rpm durante 20 minutos a 4 °C). Um total de 1500 mL de caldo de cultura foi obtido.

Exemplo 2: Purificação da protease de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC No. 0670

[00280] 1500 mL de sobrenadante do Exemplo 2 foram precipitados com sulfato de amônio (saturação de 80%) e redissolvidos em 40 mL de tampão de Tris-HCl a 25 mM, pH 7,4. A solução resultante foi ultrafiltrada com uma membrana 5K para se remover os sais e mudar tampão para Tris-HCl a 25 mM, pH 7,4, após o que foi filtrada através de um filtro de 0,45 µm. O volume final foi 30 mL. A solução foi aplicada a uma coluna Q Sepharose FF de 20 mL equilibrada em Tris-HCl a 25 mM, pH 7,4, e as proteínas foram eluídas com um gradiente linear de NaCl (0 – 0,4 M). As frações da coluna foram analisadas quanto à atividade de protease em AZCL-caseína a pH 9,0, com ou sem SSI. As frações com atividade de protease não inibida por SSI foram agrupadas. Depois, a solução agrupada foi aplicada a uma coluna Superdex75 equilibrada com Tris-HCl a 25 mM, pH 7,4, e as proteínas foram eluídas com o mesmo tampão. As frações contendo protease foram analisadas por SDS-PAGE e as frações puras foram agrupadas.

[00281] A pureza da protease purificada foi checada por SDS-page e em um gel IEF. A amostra continha somente uma protease que foi designada AP025 e divulgada aqui como os aminoácidos 1 a 177 de SEQ ID NO: 1. O

peso molecular é em torno de 23 kDa e o pI é pH 8,5.

Exemplo 3. Efeito de exo-peptidase de tripeptidilaminopeptidase de combinação de *A. niger* ou *T. reesei* com endo-protease de *Thermoascus aurantiacus* para aumento do título de etanol em processo de sacarificação e fermentação simultâneas

[00282] Um purê liquefeito preparado industrial usando Alfa-amilase-X foi usado para a experiência. Os sólidos secos determinados por equilíbrio de umidade (Mettler-Toledo) foram cerca de 30,8% de DS e o pH foi ajustado até pH 5,0 seguido por suplementação com 3 ppm de penicilina e 400 ppm de ureia. A sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) foram realizadas através de fermentações em miniescala. Aproximadamente 5 g do purê de milho liquefeito industrial foram adicionados a frascos de tubo de 15 mL. Cada frasco foi doseado com 0,6 AGU/g de DS de Combinação de glucoamilases A e quantidade apropriada de endo-protease (SEQ ID NO: 1) de *Thermoascus aurantiacus* pertencendo à família M35 com ou sem exo-peptidase nomeadamente tripeptidilaminopeptidase (TPAP) pertencendo à família S53 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 4) ou *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 3), respectivamente, como mostrado na tabela em baixo seguido por adição de 100 microlitros de levedura hidratada por 5 g de pasta semifluida. Como controle, glucoamilase e 400 ppm de ureia foram adicionados mas nenhuma adição de endo-protease ou exo-peptidase. As dosagens reais de glucoamilase e protease foram baseadas no peso exato da pasta semifluida de milho em cada frasco. Os frascos foram incubados a 32 °C. Três réplicas foram selecionadas para análise de ponto temporal de 52 horas. Em cada ponto temporal, a fermentação foi parada por adição de 50 microL de H₂SO₄ a 40%, seguida por centrifugação, e filtração através de um filtro de 0,45 micrômetros. A concentração de etanol e oligossacarídeos foi determinada usando HPLC.

Tratamentos	Endo-protease de <i>T. aurantiacus</i>	Exo-peptidase de <i>A. niger</i>	Exo-peptidase de <i>T. reesei</i>
	(µg/g de DS)	µg/g deDS	µg/g deDS
1. Controle	-	-	

2. Somente endo-protease	2,5	-	
3. Somente endo-protease	5,0		
4. Endo-protease + Tripeptidilamino-peptidase de <i>A. niger</i>	2,5	2,5	
5. Endo-protease + Tripeptidilamino-peptidase de <i>T. reesei</i>	2,5		2,5

[00283] Como mostrado nas tabelas de resultados em baixo, a combinação de endo-protease da família M35 com a família S53 de exo-peptidase TPAP aumentou o rendimento de etanol com significância estatística em comparação com controle ou endo-protease sozinha.

[00284] Rendimento de etanol às 52 horas de endo-protease sem ou com exo-peptidase.

Tratamentos	Etanol (g/L)
1. Controle	122,21
2. Somente endo-protease	125,07
3. Somente endo-protease	126,10
4. Endo-protease + Tripeptidilamino-peptidase de <i>A. niger</i>	126,22
5. Endo-protease + Tripeptidilamino-peptidase de <i>T. reesei</i>	126,22

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção de um produto de fermentação a partir de material contendo amido, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) sacarificação do material contendo amido a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização inicial do referido material contendo amido usando uma enzima geradora de fonte de carboidratos; e

b) fermentação usando um organismo fermentador; em que os passos a) e/ou b) são realizados na presença de uma mistura de endo-protease e exo-protease, em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total, e em que a endo-protease é selecionada de uma endo-protease da família M35 e a exo-protease é selecionada de uma exo-protease da família S53.

2. Processo para produção de um produto de fermentação a partir de material contendo amido, caracterizado pelo fato de compreende os passos de:

(a) liquefação do material contendo amido a uma temperatura acima da temperatura de gelatinização inicial do referido material contendo amido na presença de uma alfa-amilase;

(b) sacarificação do material liquefeito obtido no passo (a) usando uma enzima geradora de fonte de carboidratos;

(c) fermentação usando um organismo fermentador; em que os passos b) e/ou c) são realizados na presença de uma mistura de endo-protease e exo-protease, em que a exo-protease constitui pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total, e em que a endo-protease é selecionada de uma endo-protease da família M35 e a exo-protease é selecionada de uma exo-protease da família S53.

3. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1

ou 2, caracterizado pelo fato de que a sacarificação e a fermentação são realizadas simultaneamente.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a exo-protease constitui pelo menos 10% (p/p) da mistura de proteases em uma base de proteína de enzima protease total, tal como pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, particularmente pelo menos 75%, mais particularmente a exo-protease constitui de entre 5 a 95% (p/p) em uma base de proteína de enzima protease total, particularmente 10 a 80% (p/p), particularmente 15 a 70% (p/p), mais particularmente 20 a 60% (p/p) e, ainda mais particularmente, 25 a 50% (p/p) da mistura de proteases na composição em uma base de proteína de enzima protease total.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a endo-protease e a exo-protease estão presentes em uma razão de 5:2 microgramas de proteína de enzima (EP)/g de sólidos secos (DS), particularmente 5:3, mais particularmente 5:4.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a endo-protease é selecionada da família M35, mais particularmente protease M35 derivada de *Thermoascus aurantiacus*, o polipeptídeo maduro da qual compreende os aminoácidos 1-177 de SEQ ID NO: 1 ou um polipeptídeo tendo pelo menos 75% de identidade, preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 91%, mais preferencialmente pelo menos 92%, ainda mais preferencialmente pelo menos 93%, o mais preferencialmente pelo menos 94% e, ainda o mais preferencialmente, pelo menos 95%, tal como mesmo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% de identidade com

o polipeptídeo de SEQ ID NO: 1.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que a exo-protease S53 é derivada de uma estirpe de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Thermoascus*, ou *Thermomyces*, particularmente *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Thermoascus thermophilus* ou *Thermomyces lanuginosus*.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a exo-protease S53 é selecionada de uma serina protease tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 3; ou de uma serina protease tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequências com o polipeptídeo de SEQ ID NO: 4.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que uma alfa-amilase está presente ou é adicionada durante a sacarificação e/ou fermentação.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a alfa-amilase é uma alfa-amilase ácida, preferencialmente uma alfa-amilase fúngica ácida.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a enzima geradora de fonte de carboidratos é selecionada do grupo consistindo em glucoamilase, alfa-glucosidase, amilase maltogênica, pululanase e beta-amilase.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que o produto de fermentação é um álcool, preferencialmente etanol, especialmente etanol para

combustível, etanol potável e/ou etanol industrial.

13. Composição, caracterizado pelo fato de que compreende uma mistura de endo-protease e exo-protease, em que a endo-protease é selecionada de uma endo-protease da família M35 e a exo-protease é selecionada de uma exo-protease da família S53.

RESUMO

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO, E, COMPOSIÇÃO

A presente invenção se relaciona com processos melhorados para produção de etanol a partir de materiais contendo amido pelo uso combinado de pelo menos uma endo-protease e pelo menos uma exo-protease em um processo SSF, e em que a endo-protease é selecionada de uma endo-protease da família M35 e a exo-protease são selecionadas de uma exo-protease da família S53. Mais particularmente, a exo-protease deve constituir pelo menos 5% (p/p) da mistura de proteases.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 4330813289.txt
- Data de Geração do Código: 27/02/2020
- Hora de Geração do Código: 13:46:27
- Código de Controle:
 - Campo 1: 392D7BF7CC091968
 - Campo 2: B654A3A126386C88